

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GÉRIAS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Program de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Patrícia Donado Vaz de Melo

**“MAPEAMENTO DE EPITOPOS LINEARES E DESENVOLVIMENTO DE UM  
MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DOS VENENOS DE *Bothrops*  
spp. E *Crotalus durissus terrificus*”**

Belo Horizonte  
2020

**Patrícia Donado Vaz de Melo**

**“MAPEAMENTO DE EPITOPOS LINEARES E DESENVOLVIMENTO DE  
UM MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DOS VENENOS DE  
*Bothrops* spp. E *Crotalus durissus terrificus*”**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Carlos Delfín Chavez Olortegui

Co-orientador (a): Dr. Leonides Rezende Júnior

Belo Horizonte  
2020

043 Melo, Patrícia Donado Vaz de.

Mapeamento de epitopos lineares e desenvolvimento de um método de diagnóstico diferencial dos venenos de *Bothrops* spp. e *Crotalus durissus terrificus* [manuscrito] / Patrícia Donado Vaz de Melo. - 2020.

176 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Carlos Delfín Chavez Olortegui. Co-orientador (a): Dr. Leonides Resende Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Bothrops*. 3. Venenos de Serpentes. 4. Letalidade. 5. Antivenenos. 6. Mapeamento de Epitopos. I. Olortegui, Carlos Delfín Chavez. II. Resende Júnior, Leonides. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE PATRÍCIA DONADO VAZ DE MELO.** Aos vinte e quatro dias do mês de junho de 2020 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Mapeamento de epitopos lineares e desenvolvimento de um método de diagnóstico diferencial dos venenos de *Bothrops* spp. e *Crotalus durissus terrificus*"" , requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Leonides Rezende Junior Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Cláudia Lopes Penaforte (Centro Universitário de BH - UNI), aprovada; Dr. Eliane Candiani Arantes (Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de junho de 2020.

Dr. Leonides Rezende Junior Coorientador (UFMG)

Dr. Cláudia Lopes Penaforte (Centro Universitário de BH - UNI)

Dr. Eliane Candiani Arantes (Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto)

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

Coordenadora da PPG em  
 Bioquímica e Imunologia

*Felicori*

**Dr. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)**

**Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG)** *Carlos Chavez*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, antes de tudo, por me permitir escrever essas linhas, por colocar dificuldades que eu poderia superá-las e fé por acreditar que eu podia.

Ao meu orientador, Prof. Carlos, que abriu as portas do seu laboratório para uma aluna, que por trabalhar, podia se dedicar apenas metade de seu tempo. Por estar com a porta de sua sala sempre aberta, disposto a ouvir e ajudar. Por não me cobrar menos que seus demais alunos. Por ter me orientado em questões cruciais quando eu me encontrava em dúvidas. Por nunca ter duvidado de mim.

Ao meu co-orientador Leonides, que intercedeu por mim todas as vezes que precisei, que apontou e cavou a oportunidade para que eu fizesse mestrado e só então sonhasse com um doutorado e, por toda as vezes que me apoiou, ouvindo e guardando secretamente minhas queixas e reclamações.

À minha mãe por ser um exemplo de luta, coragem. Por me ensinar a ter fé, e aceitar os obstáculos e não esmorecer diante deles. Por SEMPRE torcer por mim e estar ao meu lado mesmo estando longe.

Ao meu pai, por ter me ensinado que tudo eu podia, por ter sempre me estimulado a ser quem sou, por elevar a minha auto-estima. Por sempre me fazer rir, mesmo quando ele não sabia que era o que eu precisava.

A meu amado e sempre querido marido, por ser essa pessoa tão positiva, paciente e sempre ver um lado bom em tudo. Pelo seu amor, seu companheirismo e apoio. Por aceitar minha falta de tempo, dos finais de semana na UFMG, das preocupações e ainda estar a meu lado sempre compreensivo e sem cobranças.

À minha família, em particular meu primo Guilherme por ser sempre meu amigo e super companheiro.

A Andreza Belo, por compartilhar minhas dúvidas e me responder a mesma pergunta várias vezes, por discutir os resultados comigo.

Aos meus colegas do LABIMQ, por todas as conversas, risadas, conhecimentos compartilhados, por toda ajuda necessária e por às vezes ter que suportar a minha impaciência. Em especial a Sabrina Lima e Tamara que tantas vezes me ajudaram a cuidar dos coelhos e a Priscila Araújo pelo auxílio nas imunizações.

Aos animais (Tamagoshi, Mirna, Misha e Masha) e aos camundongos por terem servido o seu corpo aos estudos, por sempre serem dóceis e por suportar com delicadeza a dureza

de ser um animal de experimento. À Daisy por ser a melhor companheira nas longas horas de escrita e estudo.

À Dra. Eliane Lustosa, por ter sido uma chefe que nunca cobrou as minhas ausências no trabalho por estar na UFMG. Por ter me apoiado nesta conquista.

Ao Jamil por toda presteza, parceria, apoio e empréstimos.

Ao Renato Renato Pereira pela ajuda profissional nas edições de imagens.

À equipe do CDICT e Labtest por compreenderem que parte de meu trabalho seria à distância, por e-mail, whatsapp e telefone.

Ao departamento de Pós-Graduação e Imunologia, UFMG e agências fomentadoras de pesquisa (CNPQ, CAPES e FAPEMIG).

A todos que não foram mencionados, porém não menos lembrados

Sem o apoio de todos, a conclusão dessa conquista não seria possível.

Os meus sinceros agradecimentos.

Porque eu sou do tamanho que  
vejo

E não do tamanho de minha  
altura

E o que vejo são os meus sonhos

**Alberto Caieiro (heterônimo  
de Fernando Pessoa)**

Tudo evolui, não há realidades  
eternas

tal como não há verdades  
absolutas

**Nietzche**

Toda coragem precisa

De um medo pra existir

Uma estranha dependência

Complicada de sentir

A coragem de levantar

O medo de cair

Use sempre a coragem

Para se fortalecer

E quando o medo surgir

Não precisa se esconder

Faça que seu próprio medo

Tenha medo de você

**Barúlio Bessa**



## RESUMO

No Brasil, os acidentes ofídicos são causados principalmente por serpentes do gênero *Bothrops* e espécie *Crotalus durissus terrificus* (*C.d. terrificus*), respectivamente 86% e 10%, dos aproximadamente 25000 casos em 2019.

O ofidismo apresenta diversas condições que precisam ser superadas. A primeira é a dificuldade em se obter um correto diagnóstico clínico, devido a sobreposição de sintomas, aliada ao baixo acesso aos serviços de saúde. Além disso, a indisponibilidade no mercado brasileiro de um produto de diagnóstico *in vitro*, por biodeteção, dos venenos de *C.d. terrificus* e do gênero *Bothrops*.

Os antivenenos são o único tratamento específico e induzem reações de hipersensibilidade, pois sua produção utiliza venenos brutos como imunógenos, e a maioria dos antivenenos possui uma grande porção de imunoglobulinas que não são direcionadas contra os componentes tóxicos do veneno. Ademais, os soros antiofídicos disponíveis, às vezes, não protegem satisfatoriamente os pacientes devido ao fato de, o antiveneno ser composto por uma mistura de anticorpos, que não reconhecem exclusivamente um componente tóxico específico, presente no veneno da serpente ofensiva.

Então, desenvolver um método de diagnóstico *in vitro* e aprimorar os antígenos utilizados na produção de antivenenos podem ser ações que reduzem as lacunas citadas.

Para tanto, por meio de precipitação de imunoglobulinas e processos de imunopurificação alcançou-se anticorpos imunopurificados, de reduzida reatividade cruzada, sem prejuízo no reconhecimento dos antígenos que lhes originaram. Estes foram utilizados tanto no mapeamento de epitopos lineares de proteínas relevantes no quadro de envenenamento, quanto para a biodeteção dos venenos.

A partir do mapeamento por Spot Synthesis, quatro epitopos lineares, Crotam1 de crotamina, Ctx2, Ctx3, Ctx4 de crotoxina foram identificados.

Devido à representatividade de crotoxina e crotamina no peso seco do veneno de *C.d. terrificus*, respectivamente 70-90% e 10-25%, os epitpos dessas proteínas foram utilizados como imunógenos para produzir anticorpos direcionados.

Então, anti-peptídeos foram produzidos em coelhos, a partir de ciclos de imunização com lipossomas incorporados com os peptídeos solúveis de 21 resíduos. Por meio de ensaios de neutralização foi possível demonstrar a habilidade dos anti-peptídeos em reduzir a letalidade do veneno de *C.d. terrificus*.

Os anticorpos anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* também foram utilizados no desenvolvimento de um método de aglutinação para detecção de veneno. As micropartículas revestidas com anti-*C.d. terrificus* aglutinaram na presença de 62 ng/mL e não apresentaram prozona até 1000 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus*. Já as microesferas sensibilizadas com anti-*Bothrops* foram reativas a concentração de veneno de *B. jararaca* entre 2,74 ng/mL e 1500 ng/mL.

Palavras chave: Mapeamento. Anti-peptídeos. Letalidade. Detecção. Aglutinação.

## ABSTRACT

In Brazil, snake accidents are caused mainly by snakes of the genus *Bothrops* and *Crotalus durissus terrificus* (*C.d. terrificus*), respectively 86% and 10%, from the approximate 25.000 incidents in 2019.

Despite the alarming numbers, snakebite envenoming presents several conditions, that need to be overcome. The first is the difficulty in obtaining a correct clinical diagnosis, due to the overlap of symptoms, combined with low access to health services. In addition, there is no “*in vitro*” diagnostic product available for biodetection of *C.d. terrificus* and *Bothrops*.

Next, there are the antivenoms, the only specific treatment currently available, which end up inducing hypersensitivity reactions, because their production uses crude venoms as immunogens, and most of the antivenoms have a large portion of immunoglobulins that are not directed against the toxic components of the venom. Furthermore, available antivenom serums sometimes do not satisfactorily protect patients due to the fact that the antivenom is composed of a mixture of antibodies, which do not exclusively recognize a specific toxic component present in the venom of the offensive snake.

Hence, developing an “*in vitro*” diagnostic method and improving the antigens used in the production of antivenoms can be actions that reduce the mentioned gaps.

Therefore, through immunoglobulin precipitation and immunopurification processes, immunopurified antibodies were obtained, with reduced cross-reactivity, without losses to the recognition of the antigens that originated them. These were used both in the mapping of linear epitopes of relevant proteins in the framework of envenoming, and for the bio-detection of venoms.

From the mapping by Spot Synthesis, four linear epitopes, crotoamine Crotam1, Ctx2, Ctx3, crotoxin Ctx4 were identified.

Due to the representativeness of crotoxin and crotoamine in the dry weight of the *C.d. terrificus*, respectively 70-90% and 10-25%, the epitopes were used as immunogens.

Thus, antipeptides were produced in rabbits, from immunization cycles with liposomes incorporated with the 21-residues soluble peptides. Through neutralization assay, it was possible to demonstrate the ability of antipeptides to neutralize the lethality of the *C. d. terrificus*.

Anti-*C.d. terrificus* and anti-*Bothrops* antibodies were also used in the development of an agglutination method for envenoming detection. Microparticles coated with anti-*C.d. terrificus* agglutinated in the presence of 62 ng/mL and did not show a prozone up to 1000 ng/mL of *C.d. terrificus* venom. The microspheres covered with anti-*Bothrops* were reactive to *B. jararaca* venom concentration between 2.74 ng/mL and 1500 ng/mL.

Key words: Mapping. Antipeptides. Neutralization. Detection. Agglutination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição estimada de envenenamentos e mortes por mordida de serpente. ....	20
Figura 2 - Venômica dos venenos de <i>C.d. terrificus</i> e <i>B. jararaca</i> .....	22
Figura 3 - Representação esquemática da ação miotóxica e neurotóxica da PLA2 e PLA2 homóloga em célula muscular esquelética (A) e terminação nervosa motora (B). ....	25
Figura 4 - Mecanismo esquemático dos sítios de ação das SVPS nos sistemas de coagulação..	28
Figura 5 - Polimerização do estireno.....	32
Figura 6 - Perfil eletroforético de IgG anticrotálica e anti- <i>C.d. terrificus</i> sobre condições redutoras e não redutoras.....	54
Figura 7 - Perfil eletroforético de Anti- <i>Bothrops</i> sobre condições não redutoras. ....	55
Figura 8 - ELISA indireto, ligação de IgG anticrotálica e anti- <i>C.d. terrificus</i> ao veneno de <i>C.d. terrificus</i> ..	57
Figura 9 - ELISA indireto, ligação dos anticorpos anti- <i>C.d. terrificus</i> e IgG anticrotálica ao pool de venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....	58
Figura 10 - ELISA indireto, ligação de anti- <i>Bothrops</i> e IgG antibotrópica com pool de veneno do gênero <i>Bothrops</i> .....	59
Figura 11 - ELISA indireto, ligação de anti- <i>Bothrops</i> e IgG antibotrópica com veneno de <i>C.d. terrificus</i> ..	60
Figura 12 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de crotamina (código Uniprot Q3PWF3).....	62
Figura 13 - Modelo 3D de crotamina baseada na estrutura cristalina código PDB - 4GV5. ....	63
Figura 14 - Alinhamento realizado na plataforma Blast entre crotamina Código Uniprot Q9PWF3 de <i>C.d. terrificus</i> e proteína tipo beta- defensina de <i>B. jararacussu</i> Código Uniprot AFG25388, representado no programa Jalview versão 2.11.0. ....	64
Figura 15 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de PLA2. 68	
Figura 16 - Modelo 3D de PLA2 código Uniprot P62022 baseado na estrutura cristalina código PDB 2QOG.....	69

Figura 17 - Alinhamento realizado na plataforma Blast entre Crotoxina B Código Uniprot P62022 de <i>C.d. terrificus</i> e PLA2 de <i>B. moojeni</i> Código Uniprot ATU8528, representado no programa Jalview versão 2.11.0.....	71
Figura 18 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de giroxina.. .....	75
Figura 19 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da giroxina Código Uniprot Q58G94 de <i>C.d. terrificus</i> e serino protease de <i>B. jararaca</i> Código Uniprot Q9PTU, representado no programa Jalview versão 2.11.0.....	76
Figura 20 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de vNGF.. .....	80
Figura 21 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da vNGF código Uniprot Q9DEZ9 de <i>C.d. terrificus</i> e vNGF de <i>B. jararacussu</i> código Uniprot Q90W38, representado no programa Jalview versão 2.11.0.....	81
Figura 22 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de zinco metaloprotease. ....	85
Figura 23 - Estrutura 3D da Bothropasina código Uniprot O93523 baseado na estrutura código PDB 3DSL.....	86
Figura 24 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da Zinco metaloprotease código Uniprot O93523 de <i>B. jararaca</i> e de <i>C.d. terrificus</i> código Uniprot Q2QA02. ....	87
Figura 25 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de SNACLEC botrocetina $\beta$ . ....	89
Figura 26 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da SNACLEC botrocetina beta código Uniprot P22030 de <i>B. jararaca</i> e SNACLEC crotoacetina de <i>C.d. terrificus</i> código Uniprot q719L8, representado no programa Jalview versão 2.11.0.....	90
Figura 27 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de PLA2.. .....	92
Figura 28 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da PLA2 código Uniprot P81243 de <i>B. jararaca</i> e de Crotoxina B de <i>C.d. terrificus</i> código Uniprot 2QOG, representado no programa Jalview versão 2.11.0.....	93
Figura 29 - Espectro de massas do Crotam1. A massa molecular esperada de Crotam1, oriundo da crotamina é de 2484,93 kDa. ....	96
Figura 30 - Espectro de massas do Ctx2. A massa molecular esperada do Ctx2, oriundo da crotoxina B é de 2472,97 kDa. ....	97

Figura 31 - Espectro de massas do Ctx3.....	98
Figura 32 - Espectro de massas do Ctx4.....	99
Figura 33 - ELISA indireto, ligação de antipeptídeos e anti- <i>C.d. terrificus</i> a crotamina, crotoxina e veneno de <i>C.d. terrificus</i> .....	101
Figura 34 - ELISA indireto, ligação de antipeptídeos e peptídeos Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4.	103
Figura 35 - Determinação da DL50 do veneno de <i>C.d. terrificus</i> .....	105
Figura 36 - Suspensão de micropartículas de 800 nm (A) e 600 nm (B) revestidas com 20% de anti- <i>C.d. terrificus</i> .....	109
Figura 37 - Ausência de aglutinação na suspensão de 600 nm avaliadas com amostras de veneno de <i>C.d.terrificus</i> nas concentrações de 16(A), 31(B) e 62(C) ng/mL. ....	110
Figura 38 - Aglutinação inespecífica das partículas de 800 nm (A) e de 600 nm (B) com revestimento de 50% de sua superfície com anti- <i>C.d. terrificus</i> . ....	111
Figura 39 - Aglutinação da suspensão de partículas de 400 nm frente as amostras contendo veneno de <i>C.d. terrificus</i> e <i>B. jararaca</i> .....	114
Figura 40 - Aglutinação da suspensão de partículas de 400 nm frente as amostras contendo veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>C.d. terrificus</i> .....	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Acidentes por serpente - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, por tipo de serpente e evolução. ....	21
Tabela 2 - Número de ampolas de antiveneno específico para cada tipo e gravidade do acidente ofídico. ....	23
Tabela 3 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondente à sequência de aminoácidos de crotamina (código Uniprot Q3PWF3).....	62
Tabela 4 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondente à sequência de aminoácidos de PLA2 (código Uniprot P62022).. ....	67
Tabela 5 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondente à sequência de aminoácidos de Giroxina (código Uniprot Q58G94).....	73
Tabela 6 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondentes à sequência de aminoácidos de vNGF (código Uniprot Q9Dez9).....	78
Tabela 7 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos da sequência de aminoácidos de zinco metaloprotease (código Uniprot O93523) reconhecidos por anticorpos antibotrópicos.. ....	83
Tabela 8 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos da sequência de aminoácidos de SNACLEC botrocetina $\beta$ (código Uniprot P22030) reconhecidos por anticorpos antibotrópicos.. ....	88
Tabela 9 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondentes à sequência de aminoácidos de PLA2 código Uniprot P81243 reconhecidos por anticorpos antibotrópicos.. ....	91
Tabela 10 - Sequência primária dos peptídeos mapeados de toxinas do veneno de <i>B. jararaca</i> .	94
Tabela 11 - Sequência primária dos peptídeos solúveis de toxinas de veneno de <i>C.d. terrificus</i> .	95
Tabela 12 - Neutralização da atividade letal de veneno <i>C.d. terrificus</i> em camundongos pelo soro anti-peptídico. ....	106
Tabela 13 - Avaliação da inespecificidade da suspensão de partículas de 400 nm revestidas com anti- <i>C.d. terrificus</i> .....	115
Tabela 14 - Avaliação da inespecificidade da suspensão de partículas de 400 nm revestidas com anti- <i>Bothrops</i> .....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS

A ou Ala - Alanina

*B. jararaca* - *Bothrops jararaca*

BSA - Bovine Serum Albumine ou Albumina de Soro Bovina

C, Cys ou Cis - Cisteína

*C.d. terrificus* - *Crotalus durissus terrificus*

Ctr - Crotamina

Ctx - Crotoxina

Ctx2 - Peptídeo 2 de crotoxina

Ctx3 - Peptídeo 3 de crotoxina

Ctx4 - Peptídeo 4 de crotoxina

D ou Asp - Ácido aspártico ou aspartato

DL50 - Dose letal 50

E ou Glu - Ácido glutâmico ou glutamato

F, Phe ou Fen - Fenilalanina

Fab - Fragment antigen-binding

Fc - Fragment crystallizable

G, Gly ou Gli - Glicina

H ou His - Histidina

I ou Ile - Isoleucina

K, Lys ou Lis - Lisina

KLH - Keyhole Limpet Hemocianina

L ou Leu - Leucina

M ou Met - Metionina

MER - Resíduos de aminoácidos

*M. frontalis* - *Micrurus frontalis*

MP - Micropartículas

N ou Asn - Asparagina

OMS - Organização Mundial da Saúde

P ou Pro - Prolina

PI - Ponto isoelétrico

Q ou Gln - Glutamina

R ou Arg - Arginina

r.p.m - Rotações por minuto

S ou Ser - Serina

T ou Thr - Treonina

V ou Val - Valina

W, Trp ou Tri - Triptofano

Y, Tyr ou Tir - Tirosina



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Visão Geral.....	19
1.2	Gênero <i>Crotalus</i> - Família Viperidae .....	23
1.3	Gênero <i>Bothrops</i> – Família Viperidae .....	28
1.4	Diagnóstico “ <i>in vitro</i> ” .....	30
1.4.1	Aglutinação em lâmina .....	31
1.5	Antivenenos .....	34
2	JUSTIFICATIVA .....	37
3	OBJETIVOS .....	39
3.1	Geral I - Utilização dos anticorpos anti- <i>C.d. terrificus</i> e anti- <i>Bothrops</i> no mapeamento de epítomos lineares.....	39
3.1.2	Específicos I.....	39
3.2	Geral II - Utilização dos anticorpos purificados anti- <i>C.d. terrificus</i> e anti- <i>Bothrops</i> no desenvolvimento de um método de aglutinação para diagnóstico “ <i>in vitro</i> ” dos venenos de <i>Bothrops</i> spp. e <i>C.d. terrificus</i> .....	39
3.2.1	Específicos II.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
4.1	Animais, veneno e antivenenos .....	40
4.2	Precipitação de imunoglobulinas.....	41
4.3	Determinação da concentração de IgG .....	41
4.4	SDS-PAGE .....	42
4.5	Purificação de anticorpos por cromatografia por imunoafinidade .....	42
4.6	Imunoensaios - ELISA Indireto .....	43

4.7	Mapeamento de epitopos e síntese dos peptídeos solúveis correspondentes.....	44
4.7.1	Ligação dos anticorpos anti- <i>C.d. terrificus</i> aos peptídeos presentes na membrana .....	44
4.7.2	Ligação dos anticorpos anti- <i>Bothrops</i> aos peptídeos presentes na membrana ...	45
4.7.3	ImageJ.....	46
4.7.4	Modelagem molecular, localização tridimensional de epitopos lineares e alinhamento	46
4.7.5	Síntese de peptídeos solúveis .....	47
4.7.6	Preparação de lipossomas e incorporação de peptídeos .....	48
4.7.7	Protocolo de imunização.....	48
4.7.8	Reatividade e especificidade dos antipeptídeos.....	49
4.7.9	Determinação da DL50 do veneno de <i>C.d. terrificus</i> .....	50
4.7.10	Ensaio de neutralização .....	50
4.8	Desenvolvimento de metodologia para diagnóstico ‘ ‘ <i>in vitro</i> ’ ’.....	51
4.8.1	Sensibilização das partículas de latex.....	51
4.8.2	Ensaio de aglutinação .....	51
5	RESULTADOS .....	53
5.1	Imunopurificação dos anticorpos anticrotálicos e antibotrópicos contra pool de venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e de <i>C.d. terrificus</i> , e vice-versa .....	53
5.2	Verificação da especificidade dos anticorpos imunopurificados anti- <i>C.d. terrificus</i> e anti- <i>Bothrops</i> .....	55
5.3	Mapeamento, por Spot synthesis, de epitopos lineares das principais toxinas do veneno de <i>C.d. terrificus</i> e <i>B. jararaca</i> .....	61
5.3.1	Membrana de spot contendo peptídeos de toxinas do veneno de <i>C.d. terrificus</i> .	61
5.3.2	Membrana de spot contendo peptídeos de toxinas do veneno de <i>B. jararaca</i> ....	82

5.4	Imunização de coelhos com lipossomas incorporados com epitopos previamente identificados	94
5.4.1	Peptídeos solúveis .....	94
5.5	Avaliação do reconhecimento dos antipeptídeos contra as toxinas e os epitopos de origemImunoensaios peptídeos e antipeptídeos .....	100
5.6	Avaliação da ação neutralizante dos antipeptídeos sob a letalidade do veneno de <i>C.d. terrificus</i>	104
5.7	Selecionar as partículas e o método de acoplamento com os anticorpos purificados	108
5.7.1	Seleção do tamanho e natureza das micropartículas .....	108
5.8	Estabelecer o protocolo de execução do ensaio de aglutinação e avaliação da sensibilidade, especificidade, reatividade cruzada e efeito prozona do ensaio de aglutinação.....	108
6	DISCUSSÃO.....	120
7	CONCLUSÃO.....	125
8	REFERENCIAS .....	126
9	ANEXOS .....	139

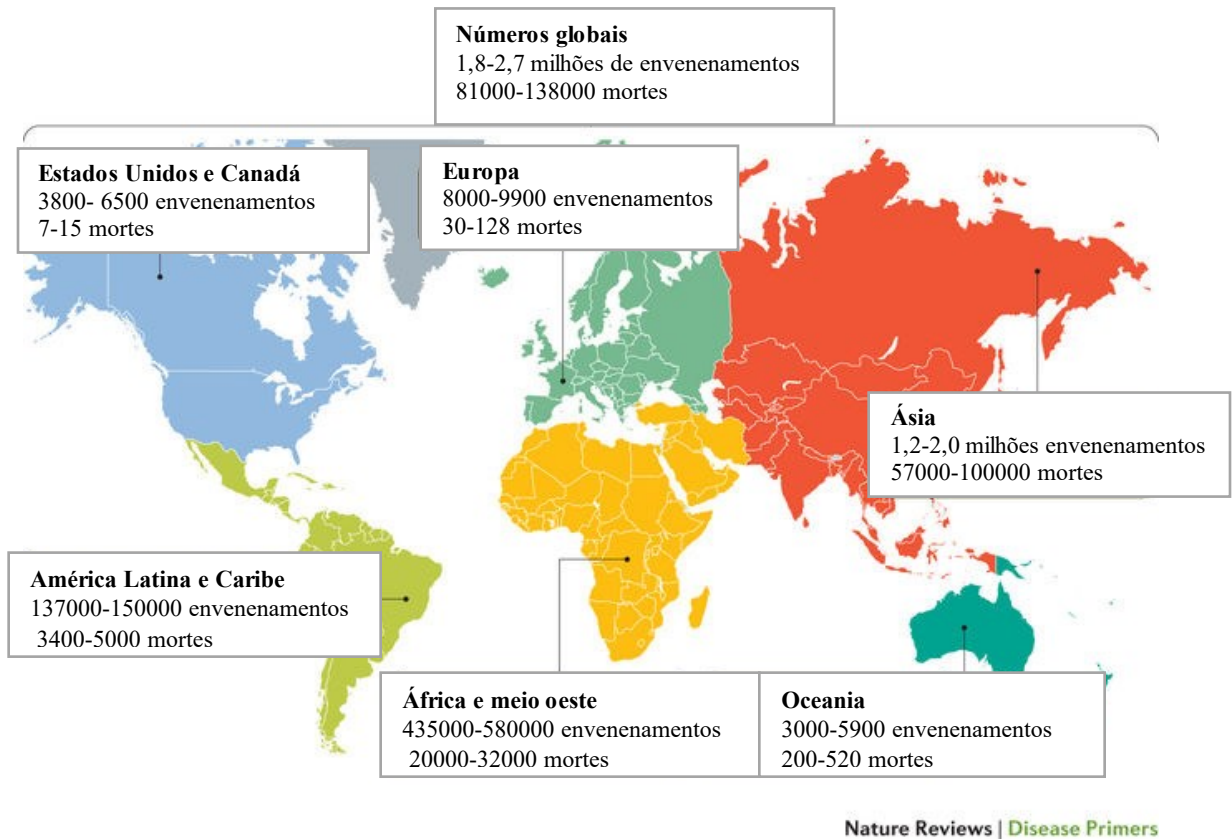
# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Visão Geral**

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os acidentes ofídicos na Categoria A das Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD), devido à sua relevância em termos de incidência, gravidade (1) e por ser um grande problema de saúde pública no mundo em desenvolvimento (Figura 1) (2,3).

Os acidentes ofídicos são uma causa importante de morbidade e mortalidade, especialmente nas áreas empobrecidas e mais quentes dos trópicos e subtropicais, como a África subsaariana, Sul ao Sudeste Asiático, Papua Nova Guiné e América Latina (4–6). Acomete pelo menos 1,8 a 2,7 milhões de pessoas por ano, combinadas com estimativas de mortalidade variando de 81.410 a 137.880 mortes (7,8).

**Figura 1 - Distribuição estimada de envenenamentos e mortes por mordida de serpente.** Os dados são uma aproximação da faixa estimada de envenenamentos e mortes por mordida de serpente, uma vez que falta informação confiável sobre morbidade e mortalidade.



**Fonte:** Adaptado de Snakebite envenoming - Nature Reviews Disease Primers. Disponível em: (3).

No Brasil, as serpentes peçonhentas de interesse em saúde pública pertencem às famílias Viperidae e Elapidae. Os acidentes estão divididos em quatro tipos: 1) botrópicos quando envolvem serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Botrocophias* – conhecida popularmente como jararaca, jararacuçu, urutu, caiçara, comboia; 2) crotálicos associados com serpentes do gênero *Crotalus* ou cascavel; 3) laquéuticos relacionados com serpentes do gênero *Lachesis* – ou surucucu-pico-de-jaca e por último 4) elapídico quando envolve acidentes com serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* chamadas de coral-verdadeira.

As serpentes do gênero *Crotalus* são as mais letais (1,24%) e responsáveis por 10,8% dos acidentes com mordidas de serpente registrados em 2019, sendo precedidas apenas por serpentes do gênero *Bothrops*, 85,4%, com baixa letalidade (0,49%) (9). Portanto, aproximadamente 96% dos acidentes notificados no Brasil estão associados a estes dois gêneros de serpentes.

**Tabela 1 - Acidentes por serpente** - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, por tipo de serpente e evolução. No ano de 2019. Legenda: Ign – ignorados.

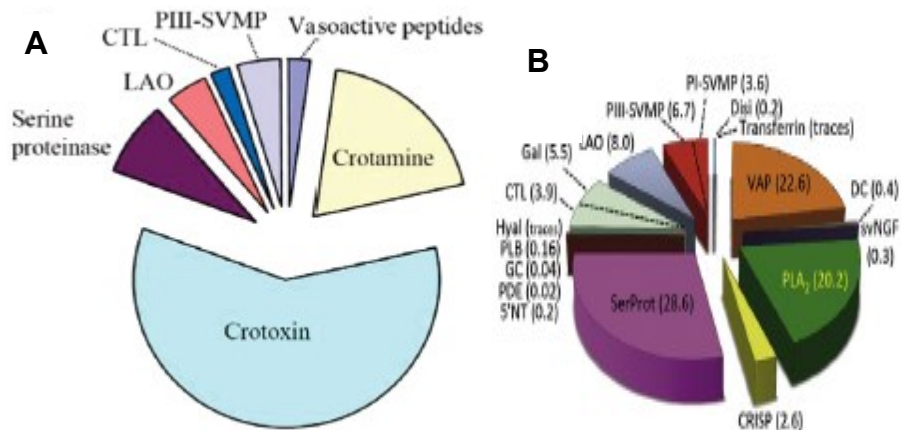
Tipo Serpente	Ign/Branco	Cura	Óbito pelo agravo notificado	Óbito por outra causa	Total (Nº absoluto)	Total (Percentual %)	Letalidade (Percentual%)
<i>Bothrops</i>	3262	17644	96	7	21009	85,4	0,49
<i>Crotalus</i>	383	2236	32	1	2652	10,8	1,24
<i>Micrurus</i>	55	271	1	-	327	1,3	0,31
<i>Lachesis</i>	56	560	4	2	622	2,5	0,96
<b>Total</b>	3756	20711	133	10	24610	100	

**Fonte:** Adaptado de: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: (10)

A composição dos venenos de serpentes são de alta complexidade e diversidade (11), podendo conter diferentes proteínas e peptídeos tóxicos e não tóxicos, além de carboidratos, lipídeos, amins e outras pequenas moléculas capazes de causar a ruptura dos processos fisiológicos ou bioquímicos normais e, funcionalmente relacionados à propriedades de imobilizar, matar, e digerir a presa bem como na defesa de predadores (12).

Os diversos componentes antigênicos tais como metaloproteases, L-aminoácidos oxidases (LAAO), serino proteases, lectinas tipo C, fosfolipases, peptídeos vasoativos (VAP), etc (13,14), são semelhantes entre os venenos dos diversos gêneros de serpentes (Figura 2) mesmo que em percentuais distintos. Então, os venenos de serpentes por serem uma misturas complexas de proteínas exercem uma ampla gama de ações tóxicas, e, a alta variabilidade na sua composição é responsável pelas várias manifestações clínicas em envenenamentos (3).

**Figura 2 - Venômica dos venenos de *C.d. terrificus* e *B. jararaca*** - Composição proteica geral dos venenos de A) *C.d. terrificus* e B) *B. jararaca*. Em B, o valor entre parênteses representa em percentual as proteínas no veneno. LAO – L-amino ácido oxidase; CTL – Molécula semelhante à lectina tipo C; PI e PIII - SVMP -  $Zn^{+2}$  metaloprotease do tipo I e III, SerProt – serino protease; VAP – Peptídeos vasoativos; PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>; CRISP – Proteína secretória rica em cisteína; svNGF – Fator de crescimento neural de veneno de serpente; DC - disintegrina/domínio rico em cisteína, Disi – disintegrina; Gal – lectina oxidase ligada a galactose; Hyal – hialuronidase; PDE – fosfodiesterase; GC – glutamil ciclotransferase; 5'NT -5' nucleotidase e PLB - fosfolipase B.



**Fonte:** Figura A disponível em (13) e figura B disponível em (14).

Nos acidentes botrópicos os sintomas clínicos são dor local, edema, hemorragia e necrose no local da mordida, podendo ocorrer, em casos mais graves, choque cardiovascular, disfunção na coagulação, hemólise e falência renal (15). Tais sintomas são semelhantes aos observados nos acidentes laquéticos. A diferenciação clínica se faz quando, nos acidentes laquéticos, estão presentes alterações vagas (náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, hipotensão e choque) (16).

Por sua vez, no acidente crotálico, o local da mordida muitas vezes não apresenta dor ou lesão evidente, apenas uma sensação de formigamento; dificuldade de manter os olhos abertos, com aspecto sonolento (fácies miastênicas), visão turva ou dupla, mal-estar, náuseas e cefaléia, acompanhadas por dores musculares generalizadas e hematúria nos casos mais graves.

Acidentes por coral-verdadeira acarretam discreta dor local, visão borrada ou dupla, pálpebras caídas e aspecto sonolento.

Apesar de distintos, algumas manifestações clínicas dos acidentes botrópicos e crotálicos podem apresentar sintomas similares, como parestesia, edema, alterações no tempo de coagulação, oligúria, anúria e hemoglobina e/ou mioglobina na urina (17), o que dificulta a conduta médica em relação ao tratamento específico com soro antiofídico (18), bem como, o

estabelecimento da administração da dose correta do soro (Tabela 2), único tratamento específico para envenenamento por animais venenosos (19).

**Tabela 2 - Número de ampolas de antiveneno específico para cada tipo e gravidade do acidente ofídico.**

Acidente	Antiveneno	Gravidade	Nº de ampolas
Botrópico	SAB <sup>b</sup> SABL <sup>c</sup> ou SABC <sup>d</sup>	Leve: quadro local discreto, sangramento discreto em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação	2 a 4
		Moderado: edema e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação	4 a 8
		Grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão/choque, insuficiência renal, anúria; pode haver distúrbio na coagulação	12
Laquétrico <sup>a</sup>	SABL	Moderado: quadro local presente; pode haver sangramentos, sem manifestações vagas	10
		Grave: quadro local intenso, hemorragia intensa, com manifestações vagas	20
Crotálico	SAC <sup>e</sup> ou SABC	Leve: alterações neuromusculares discretas; sem mialgia, escurecimento da urina ou oligúria	5
		Moderado: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobínúria (urina escura) discretas	10
		Grave: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobínúria intensas, oligúria	20
Elapídico	SAEla <sup>f</sup>	Considerar todos os casos como potencialmente graves pelo risco de insuficiência respiratória	10

Fonte: Adaptado do Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2001) e do Guia de Vigilância Epidemiológica (2009).

<sup>a</sup>Devido à potencial gravidade do acidente laquétrico, são considerados clinicamente moderados ou graves, não havendo casos leves.

<sup>b</sup>SAB = Soro antibotrópico (pentavalente);

<sup>c</sup>SABL = Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquétrico;

<sup>d</sup>SABC = Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico;

<sup>e</sup>SAC = Soro anticrotálico;

<sup>f</sup>SAEla = Soro antielapídico (bivalente).

**Fonte: Guia de Vigilância em Saúde, Volume único, 3ª Edição, 2019.** Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/25/guia-vigilancia-saude-volume-unico-3ed.pdf>

## 1.2 Gênero *Crotalus* - Família Viperidae

As cascavéis estão dispersas desde o norte da América do Norte (sul do Canadá) até o sul da América do Sul (nordeste da Argentina) dando origem a cerca de 70 espécies e subespécies (20,21). No Brasil, o gênero *Crotalus* é representado por uma única espécie a *Crotalus durissus* (22).

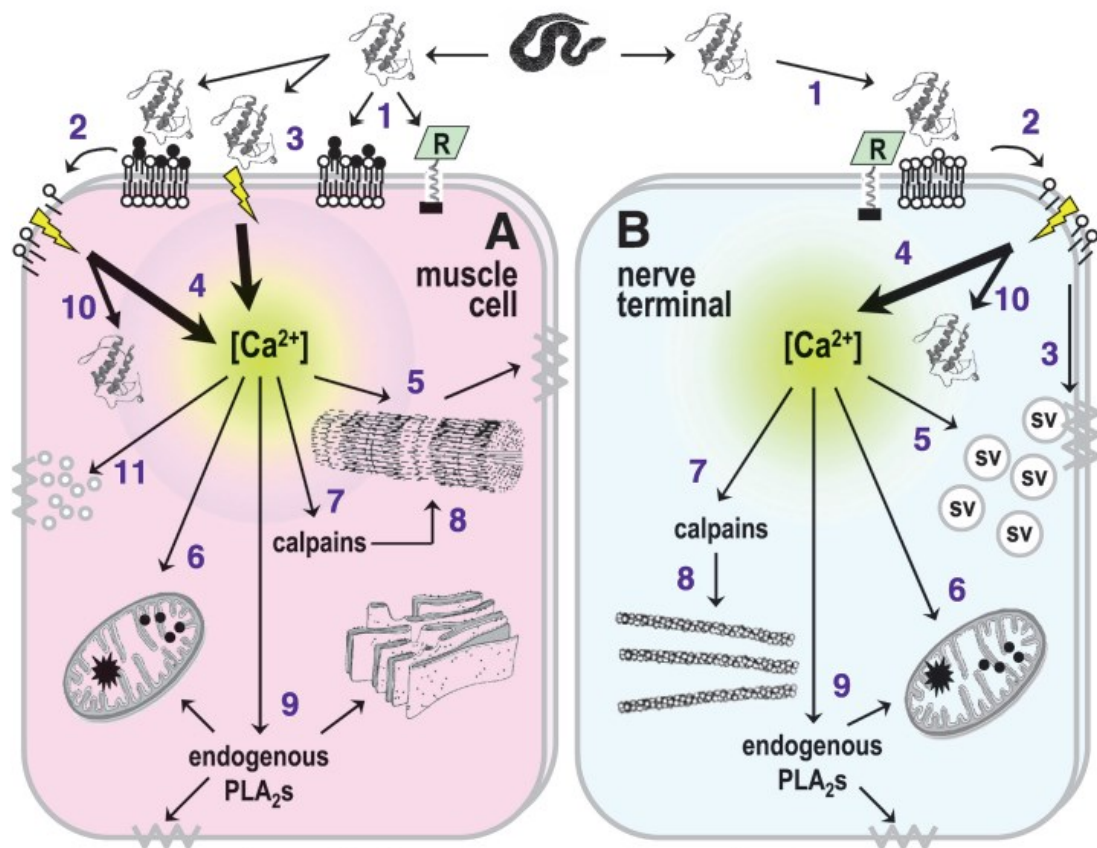
*Crotalus durissus*, conhecida vulgarmente como cascavel, maracambóia, maracabóia, boicininga e cascavelha vive em áreas abertas, campos, regiões secas e pedregosas. Uma de suas características mais marcantes é a presença de um chocalho na ponta da cauda (23). A cascavel, não sai completamente de sua pele antiga e mantém parte dela enrolada na cauda em forma de um anel cinzento grosseiro. Com o correr dos anos, estes pedaços de epiderme ressecados formam os guizos que, quando o animal vibra a cauda, balançam e causam o ruído característico (24).



Os sinais e sintomas previamente citados, apresentados pelos pacientes envolvidos em acidentes crotálicos são consequência das atividades neurotóxicas, miotóxicas (Figura 3) e coagulante do veneno (23).

O principal componente do veneno da *C.d. terrificus* é a crotoxina, uma fosfolipase A<sub>2</sub>, neurotóxica que exerce sua patofisiologia por bloquear a transmissão neuromuscular. Seus efeitos são preliminarmente pré-sinápticos, causando uma típica modificação trifásica na liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas (depressão, facilitação e bloqueio final). A crotoxina atua também pós sinápticamente por bloquear a resposta a acetilcolina por meio da estabilização de seu receptor em um estado conformacional inativo (25).

**Figura 3 - Representação esquemática da ação miotóxica e neurotóxica da PLA2 e PLA2 homóloga em célula muscular esquelética (A) e terminação nervosa motora (B).** O passo 1 representa as miotoxinas (painel da esquerda) ou neurotoxinas (painel da direita) ligados tanto a receptores proteicos de alta afinidade (R) quanto domínios lipídicos de baixa afinidade da membrana plasmática. Passo 2 é a hidrólise de fosfolípidos que ocorre tanto para mio- quanto neurotoxinas que causa alteração da estrutura da membrana. As miotoxinas, enzimaticamente inativas atuam via perturbação direta da membrana (painel da esquerda, passo 3). Passos 2 (ambos painéis) e 3 (painel da esquerda) representam a membrana plasmática perturbada da qual torna-se permeável aos íons, então perdendo seu potencial de membrana e permitindo um influxo de cálcio do meio extracelular. Tal alteração da membrana promove a exocitose de vesículas sinápticas (SV) de pronta liberação no terminal nervoso (passo 3, painel direito). Passo 4, ambos os painéis, representam um grande incremento na concentração de cálcio citosólico, que induzirá a hipercontração de miofilamento (passo 5, painel da direita) e por sua vez pode causar danos mecânicos na membrana plasmática. O elevado incremento de cálcio citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  causa exocitose do pool de reserva de vesícula sináptica (passo 5, painel da direita). A captação de cálcio pela mitocôndria, através do uniporte, resulta em inchaço destas organelas, desorganização da crista, formação de cristais de hidroxapatita e e abertura de poros, então resultando em um severo prejuízo na função mitocondrial (passo 6, ambos os painéis). Proteinases  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes (calpains) são ativadas (passo 7) e degradam componentes do citoesqueleto (passo 8, ambos os painéis) afetando adicionalmente a integridade mecânica da célula. PLA2 citosólicas  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes são ativadas e promovem hidrólise adicional de membranas intracelular e plasmática (passo 9 ambos os painéis). A ruptura da membrana plasmática permite a entrada de neurotoxinas e possivelmente PLA2 miotóxicas (passo 10, ambos os painéis) do qual hidrolisam e danificam o sistema de membranas intracelulares, até sua inativação por eventos moleculares ainda indeterminados.



Fonte: Disponível em (26).

Estruturalmente, a crotoxina é um heterodímero constituído por uma subunidade de PLA2, tóxica (B, básica) e por uma subunidade menor, atóxica (A, ácida), denominada crotapotina. Os dois componentes têm comportamento sinérgico, pois quando o complexo Crotoxina (A+B) interage com a membrana sináptica, o componente B se liga à membrana com elevada especificidade em comparação ao componente B isolado. Então, o componente A se dissocia sendo liberado em solução (27).

A primeira estrutura cristalográfica de CB, a subunidade básica e tóxica de Ctx (Crotoxina), foi descrita em 2007 (28), da qual há o arranjo de dois heterodímeros contendo as isoformas CB1 e CB2. As duas isoformas de CB que formam o modelo cristalográfico tetramérico possuem sete ligações de dissulfeto e, como outras PLA2 do grupo IIA, apresentam uma  $\alpha$  hélice N-terminal (h1), um loop no qual ocorre a ligação  $\beta$  ao  $\text{Ca}^{2+}$ , duas  $\alpha$  hélices antiparalelas (h2 e h3), duas fitas formadas por folhas  $\beta$  antiparalelas e uma alça no C-terminal. Em contraste, a "hélice curta" localizada entre a hélice h1 e a alça de ligação  $\beta$  de  $\text{Ca}^{2+}$  de outras PLA2 do grupo IIA não foi bem caracterizada nos modelos CB1 e CB2.

A crotoxina constitui um exemplo de potencialização molecular, uma vez que a subunidade ácida e não tóxica (CA) dificulta a formação de interações não específicas entre o Asp49 da PLA2 básica e seus substratos ou outras moléculas. Após a ligação entre Ctx e seus alvos moleculares, o complexo se dissocia, induzindo potentes efeitos neurotóxicos, citotóxicos e miotóxicos (27).

O componente A ligado a B eleva a eficácia farmacológica de PLA2 por evitar sua adsorção inespecífica às membranas. Portanto, a crotapotina comporta-se como chaperone de B e direciona a PLA2 aos receptores nas junções neuromusculares por evitar sua ligação em locais inespecíficos. O processamento proteolítico, dos componentes ácido e básico da crotoxina, tem sido descrito como “enhancer” da toxicidade da subunidade A (PLA2). Alternativamente tem-se sugerido que a oligomerização é uma estratégia evolutiva para aumentar a afinidade de ligação e especificidade (29).

Os efeitos neurotóxicos associados à crotoxina são olhos pesados, paralisia muscular facial, especialmente ao redor da boca, visão turva, ptose, oftalmoplegia externa e paralisia muscular respiratória progressiva. Já os efeitos miotóxicos incluem dor muscular difusa, urina vermelha à marrom, redução do tempo de coagulação, aumentos nos níveis séricos de creatino quinase (CK), desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e aldolase. Falha renal aguda é o mais importante sintoma sistêmico (26).

A crotamina, outro componente abundante no veneno de *C.d. terrificus*, é uma proteína de 42 resíduos que pertence à família das miotoxinas. A proteína em solução possui estrutura

monomérica como indicado em medidas de SAXS (Small-angle X-ray scattering) e dispersão de luz dinâmica (30), mas na estrutura de cristal, três moléculas de crotamina estão presentes na unidade assimétrica (31), conforme determinado por técnicas de dispersão anômala de um único comprimento de onda e refinado a uma resolução de 1,7 Å. Apesar das diferenças na composição de aminoácidos, a crotamina possui o mesmo esqueleto estrutural que as  $\alpha$ -defensinas e  $\beta$ -defensinas de mamíferos, constituída por um núcleo de folhas  $\beta$  de três cadeias e uma estrutura de alças estabilizada por pontes de dissulfeto constituídas por seis cisteínas (32).

A crotamina é capaz de induzir mionecrose e despolarização de membranas musculares esqueléticas por aumentar a permeabilidade ao íon  $\text{Na}^+$  (33), e, em baixas dosagens possui atividade analgésica envolvendo ambos os mecanismos periférico e central (34).

Outra toxina relativamente profusa é a giroxina, uma glicoproteína de 33 kDa com 3,8% de seu peso composto pela unidade de açúcar e uma das principais serino proteases do veneno de *C.d. terrificus*, representando cerca de 2% do teor de proteína no veneno bruto (35).

A giroxina é capaz de induzir contrações sistêmicas do músculo esquelético (36) e posteriormente perda de equilíbrio e subseqüentes rotações completas em torno do eixo longitudinal em ratos após a injeção experimental (barrel roll). Além destes efeitos tóxicos neurológicos típicos, a giroxina exhibe atividade semelhante à trombina como a clivagem do fibrinogênio (37).

Ademais destes componentes tóxicos outras proteínas como a vNGF (Fator de crescimento neural de veneno), provoca efeitos não neuronais tais como a indução do extravasamento plasmático e o aumento da liberação de histamina induzida por C5a de leucócitos humanos (38) e sugere que este pode facilitar o acesso de componentes tóxicos ao local de ação e provavelmente aumentar a distribuição do veneno na área afetada (38,39).

No venendo de *C. durissus* há também a crotacetina, membro da família de lectinas de tipo C do veneno de cobra (SNACLEC), possui a propriedade de agregar plaquetas e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e negativas (40). Apesar de lectinas do tipo-C de venenos de serpente serem diversas, elas são restritas ao veneno de viperídeos, ou seja, a família a qual pertence a *C. durissus* (41,42).

Diversas toxinas não citadas como metaloprotease, LAAO, VAP entre outras, associadas às mencionadas anteriormente, presentes no veneno de *C.d terrificus*, são responsáveis pelo quadro clínico observado nos acidentes crotálicos.

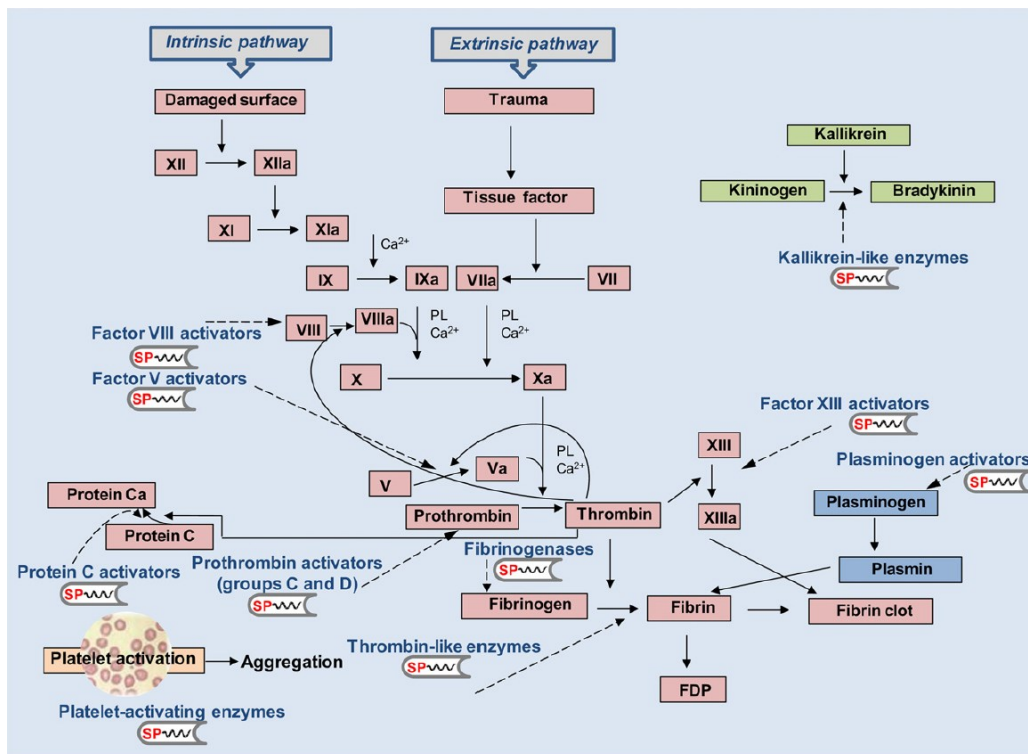
### 1.3 Gênero *Bothrops* – Família Viperidae

A família Viperidae compreende cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. Habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha) (43).

As espécies de maior importância em saúde no estado de Minas Gerais são: *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*), *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, e *B. neuwied*. A mistura dos venenos destas serpentes é utilizada na produção do soro antiofídico pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED)(23).

Os sintomas clínicos do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* como desequilíbrio no sistema hemostático estão relacionados com componentes como serino-proteases (SVSP – snake venom serine proteinase), que são enzimas proteolíticas semelhantes à tripsina que atuam nos componentes da cascata da coagulação, sistema fibrinolítico caliceína-cinina e plaquetas causando desequilíbrio no sistema hemostático (Figura 3) (44).

**Figura 4 - Mecanismo esquemático dos sítios de ação das SVPS nos sistemas de coagulação.** Mapeamento de vários pontos chave da cascata da coagulação; plaquetas, sistema fibrinolítico caliceína-cinina, onde ocorre desequilíbrio hemostático por ação de proteólise das SVPS.



Fonte: Disponível em (44).

As metaloproteínas zinco dependentes também são responsáveis pela potente atividade hemorrágica. As principais metaloproteases hemorrágicas isoladas a partir do veneno de *B. jararaca* são a Bothropasina de 48 kDa e a Jararagina com 52 kDa. Ambas, pertencem à classe PIII, da subfamília da reprotisina de metaloproteases dependentes de zinco que possuem, além do domínio catalítico (M), domínios desintegrina (D) e ricos em cisteína (C) (45,46).

As SMVP (snake venom metalloproteinase) degradam vários componentes da membrana basal e também hidrolisam proteínas da membrana endotelial, tais como as integrinas e caderinas, envolvidas na adesão célula –matriz e célula-célula. Além disso, domínios do tipo desintegrina presentes na estrutura da SMVP, ricos em cisteínas, interferem com a adesão à matriz extracelular (47).

Já os efeitos edematogênicos causados pelo envenenamento botrópico tem origem na reação de hidrólise pela PLA<sub>2</sub> que promove a liberação de lisofosfolípidos e ácido araquidônico, precursores de moléculas pró-inflamatórias como prostaglandinas e leucotrienos que aumentam a permeabilidade microvascular, recrutamento de leucócitos para tecidos e edema (48). A formação do edema também pode ocorrer via ativação dos mastócitos e liberação de histamina (49) (50).

Nesse veneno, observa-se também as lectinas do tipo-C (SNACLEC) consideradas famílias secundárias de proteínas, pois são grupos (KUN- peptídeos Kunitz, CRISP- proteína secretória rica em cisteína, LAAO, CTL, DIS-disintegrinas e NP-peptídeo natriturético) que estão comumente presentes nos venenos, mas em quantidades muito menores que as famílias dominantes (PLA<sub>2</sub>, SVMP, SVSP and 3FTx –toxinas three fingers) (51).

A botrocetina, uma SNACLEC de veneno de *B. jararaca*, é um heterodímero composto pela subunidade alfa de 133 resíduos de aminoácidos e pela subunidade beta com 125 resíduos de aminoácidos, mantidas juntas por uma ligação dissulfeto (52). A diferença entre as cadeias reside no n-terminal que não apresentam nenhuma similaridade entre si (53).

Por possuir a capacidade de induzir a aglutinação por meio da ligação do fator von Willebrand a glicoproteína Ib (GPIb) nas plaquetas são chamadas de coagulininas (54).

Outros componentes tóxicos do veneno como: 1) hialuronidase, caracterizada por ser responsável no espalhamento do veneno, facilitando sua invasão no organismo da vítima e nos vasos sanguíneos por meio da hidrólise dos glicosaminoglicanos e ácido hialurônico (55) e 2) LAAO capaz de induzir a necrose e apoptose atribuídos à produção de peróxido de hidrogênio por oxidação de  $\alpha$ -amino ácidos (56) contribuem para os sintomas de envenenamento por serpentes deste gênero.

#### 1.4 Diagnóstico “*in vitro*”

Em acidentes ofídicos, é um desafio para os médicos que tratam os pacientes mordidos, determinarem as espécies responsáveis pelo envenenamento dificultando o tratamento com o antiveneno correto, especialmente em regiões onde apenas os antivenenos monoespecíficos (produzidos a partir do veneno de uma única espécie) estão disponíveis. Esta foi uma das principais razões que determinou o desenvolvimento de técnicas de ensaio usando imunodiagnóstico entre outros métodos laboratoriais (57).

Além das dificuldades mencionadas, as diretrizes clínicas atuais recomendam a retenção da administração de antiveneno até que sintomas de envenenamento sejam detectados em pacientes com mordida de serpente. Ou seja, o momento de iniciar o tratamento com antiveneno pode ser penoso, pois os sinais de envenenamento e seu tempo de início variam com o gênero de serpente, a quantidade de veneno injetado, o local de injeção e a idade e a saúde do indivíduo (19).

O diagnóstico de mordida de serpente ou a determinação de qual animal é responsável pelo acidente pode ser convenientemente dividido em clínico e laboratorial.

O diagnóstico clínico depende do reconhecimento de sinais específicos de envenenamento no paciente. Isso inclui sinais locais como inchaço, formação de bolhas, necrose local e sinais sistêmicos que podem auxiliar num diagnóstico mais assertivo (57), como hemorragia, sangue incoagulável e choque hipovolêmico (gênero *Bothrops*) em contraste com sinais neurotóxicos (gênero *Crotalus*). No entanto, a heterogeneidade inter e intraespecífica na composição do veneno, pode ser responsável por diferenças nos sintomas observados em vítimas humanas de envenenamento pela mesma espécie de serpente em diferentes regiões geográficas (58).

O diagnóstico laboratorial da mordida de serpente é baseado na detecção de: alterações nos parâmetros sanguíneos como prolongamento ou redução dos tempos de coagulação, plaquetopenia, alterações nas contagens de hemácias e leucócitos, presença/ausência de mioglobínúria, alterações enzimáticas (elevação de creatino quinase) e a detecção de antígenos específicos do veneno no sangue das vítimas (métodos de biodetecção por técnicas de base imunológica (57).

Há anos, um grande número de sistemas baseado em ensaios imunológicos tem sido aplicado para a detecção de venenos e também para a detecção de anticorpos. Tais ensaios incluem imunodifusão, imunofluorescência, hemaglutinação, imunoeletroforese,

radioimunoensaio (RIA), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e PCR (Polimerase Chain Reaction) (59).

As características de alguns métodos como a falta de sensibilidade da imunodifusão (60); instabilidade e variação no processo de acoplamento dos venenos às hemácias na hemaglutinação (61), elevado número de bandas de precipitação comuns entre venenos e anticorpos de espécies estreitamente relacionadas na técnica de imunoprecipitação (62), custo e toxicidade dos reagentes de radioimunoensaios (63), etapas de incubação prolongadas, mão-de obra qualificada e equipamento específicos como no ELISA (64) dificultam a introdução de tais métodos à rotina laboratorial; principalmente em locais distantes dos grandes centros urbanos, onde frequentemente a população é acometida por tal doença tropical negligenciada.

Portanto, algo imprescindível para superar as dificuldades do diagnóstico e tratamento do ofidismo se dá por meio de desenvolvimento de método de diagnóstico específico, sensível, rápido, mas de simples execução, que requer estrutura e capacitação técnica mínimas, passos de incubação otimizados em temperatura ambiente e discriminação visual das densidades óticas entre a amostra e o controle (65), fornecendo aos médicos, em hospitais rurais, informações que permitem a detecção precoce do envenenamento e identificação das espécies causadoras das mordidas.

O método de aglutinação em lâmina (66) é uma eficiente alternativa para aprimorar o diagnóstico “*in vitro*”, o tratamento dos acidentes ofídicos, e ainda permitir a extração de dados epidemiológicos de número e distribuição de mordidas (67); fornecendo números para a produção e distribuição racional de antivenenos. Tal método é um teste simples, barato, rápido, que não exige equipamentos e estruturas laboratoriais complexas, permitindo o acesso da população rural que possui a dificuldade usual de transporte até um centro médico (67).

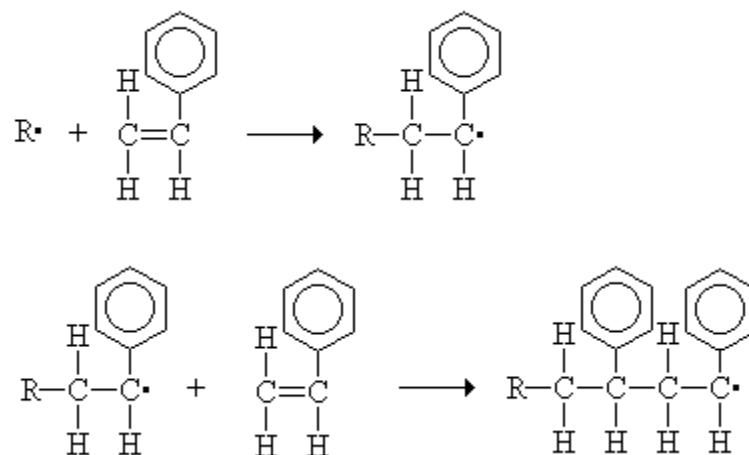
#### **1.4.1 Aglutinação em lâmina**

Em 1948, foi descrito por Rose, a técnica em que a aglutinação de eritrócitos de ovinos, sensibilizados com IgG anti-ovinos de coelho, aglutinavam na presença de soros de pacientes com artrite reumatóide (68). Porém, os eritrócitos ovinos contêm muitos antígenos que podem reagir inespecificamente com componentes de soros humanos, e, além disso, as células do mesmo animal podem não produzir um título constante em testes repetidos na mesma amostra de soro (69). Diante deste cenário, havendo a necessidade de eliminar a interferência causada pelas hemácias, Singer e Plotz em 1956, introduziram a detecção de fator reumatoide substituindo os eritrócitos por látex (70).



O látex usado como suporte são micropartículas de poliestireno (MP), resultantes da polimerização do estireno. A cadeia inicial ocorre quando um radical livre de sulfato reage com a dupla ligação do monômero estireno. A resultante radical livre de estireno reage com moléculas adicionais de estirenos para produzir cadeias de alto peso molecular de poliestireno. A terminação da cadeia ocorre quando duas cadeias alongadas reagem para formar um cadeia de polímero com sulfatos terminais (Figura 5). As cadeias de poliestireno espontaneamente coalescem para formar esferas devido a sua insolubilidade com a água. Já os grupo sulfatos localizados na superfície podem interagir com a água (71).

**Figura 5 - Polimerização do estireno.** O radical sulfato é indicado como R·.



**Fonte:** Disponível em (71)

Atualmente, existem vários meios de conectar ligantes biológicos a microesferas, utilizadas como suportes de fase sólida em testes imunológicos, incluindo adsorção em microesferas poliméricas simples, ou covalentes, por meio de fixação a microesferas funcionalizadas na superfície. O método original para ligação de proteínas a microesferas hidrofóbicas é a adsorção passiva, devido à simplicidade e flexibilidade para realizar o acoplamento, pois, para anexar o ligante de interesse às microesferas é necessário apenas incubar os dois juntos por um período de tempo (72).

O mecanismo de adsorção é baseado principalmente em interações hidrofóbicas (Van der Waals, London Type) entre as porções hidrofóbicas dos ligantes adsorvidos e a superfície polimérica das microesferas. Este é o meio de ligação para a maioria dos ligantes hidrofóbicos, incluindo imunoglobulinas (73).

No caso de anticorpos, a porção Fc da proteína é geralmente mais hidrofóbica e, portanto, com maior probabilidade de adsorção, do que a região Fab (ajudando a garantir que

as proteínas estejam ligadas em suas orientações mais biologicamente ativas). É possível, no entanto, que os anticorpos possam ser ligados de uma forma que não a orientação ideal, e isso pode ser evitado adicionando um grande excesso do ligante, para garantir uma adsorção vertical da proteína (74)

Desde então, a técnica que envolve microesferas revestidas por antígeno/ anticorpo e sua reação com o seu correspondente anticorpo/antígeno resultando em aglomerados visíveis, tem sido utilizada para detectar bactérias (75), vírus (76), proteínas de fase aguda (77), protozoários (78), fungos (79), venenos (80), etc.

Alguns estudos já foram publicados no que tange ao desenvolvimento de testes de aglutinação para detecção de antivenenos ou veneno de serpentes. O trabalho de Chander *et al* (81), se trata de partículas de látex revestidas com veneno de diversas serpentes, como *Naja naja* (Cobra), *Bungarus ceruleus* (Krait), *Daboia russelli* (Russell's viper) e *Echis carinatus*, utilizadas para avaliar a potência dos antivenenos, e, portanto, sua aplicação seria como ensaio de controle da qualidade dos antivenenos.

Para detectar o veneno de Thai cobra (*Naja kaouthia*) foi desenvolvido um kit contendo partículas de látex sensibilizadas com imunoglobulinas específicas do veneno. O limite de detecção reportado foi de 25-50 ng/mL e especificidade foi verificada contra veneno de diversas espécies como: *Vipera russelli*, *Calloselasma rhodostoma*, *Trimeresurus albolabris*, *Naja siamensis*, *Ophiophagus hannah*, e *Bungarus fasciatus* (80).

Outro método para detecção dos venenos de *Naja naja siamensis*, *Bunearus fasciatus* e *Ophiophapus hannah* da família Elapidae, *Vipera russelli*, *Calloselasma rhodostoma* e *Trimeresums albolabris* da família Viperidae foi proposto. Neste, imunoglobulinas de coelhos antivenenos, após precipitação com sulfato de amônio e purificação por coluna de proteína A, foram utilizadas no revestimento das partículas (82).

Para a detecção de venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, Lión *et al* (66), usaram anticorpos anticrotálicos e antibotrópicos de cavalo, precipitados por sulfato de amônio. A sensibilidade detectada para ambos os venenos foi de 167 mg/mL e a especificidade contra venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e escorpião (*Tityus caripitenses*) (83), resultou em ausência de aglutinação para a presença de ambos. No entanto, a sensibilidade determinada está aquém do necessário para o diagnóstico “*in vitro*”, pois, estudos de detecção do veneno circulante de *C.durissus* e gênero *Bothrops*, em amostras de soro humano de pacientes, constataram que a concentração de veneno de ambas as espécies presente nas amostras são da ordem de ng/mL (64,84).

Para desenvolver um método de diagnóstico “*in vitro*” por aglutinação é necessário adotar uma estratégia racional a se iniciar por: 1 - seleção do diâmetro das partículas, 2 - obtenção de partículas funcionalizadas ou não, 3 - realizar experimentos de adsorção ou de ligação covalente, 4 - bloquear as partículas sensibilizadas, 5 - realizar ensaios de imunoaglutinação e 6 - otimização do tampão de estocagem (85).

Em posse das partículas sensibilizadas e bloqueadas, para proceder ao imunoensaio é necessário aprimorar a relação amostra/reagente e o tempo de reação, objetivando-se alcançar sensibilidade e reatividade específica (85).

Outras características que devem ser almejadas é a estabilidade coloidal e velocidade na formação dos imunoaglutinados (85).

## 1.5 Antivenenos

Antivenenos são o único antídoto específico e efetivo para tratar os efeitos sistêmicos originados de acidentes ofídicos (86).

Em geral, a produção de antivenenos envolve a imunização de animais, geralmente cavalos, com venenos de uma (monoespecífico) ou várias espécies de serpentes (poliespecífico). Após a coleta de sangue, este é fracionado para extrair e purificar diversas substâncias de imunoglobulinas ativas (87). São obtidos três tipos de antivenenos ativos dependendo do protocolo de fracionamento: (a) IgG total, isolada usando sulfato de amônio ou ácido caprílico (88); (b) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, preparados por digestão com pepsina, a remoção da porção Fc do fragmento Fab se faz no intuito de reduzir as reações adversas, e fracionamento com sulfato de amônio ou ácido caprílico (89) e; (c) monovalente Fab, preparado por digestão de papaína e fracionamento de sulfato de amônio (90).

Atualmente, os antivenenos disponíveis no Brasil são preparações líquidas contendo F(ab')<sub>2</sub> purificado de cavalo, fabricados por quatro laboratórios públicos: o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), a Fundação Ezequiel Dias (FUNED), o Instituto Butantan e o Instituto Vital Brasil (43). Tais produtos imunobiológicos são caros, escassos, pobremente distribuídos nas áreas onde são necessários e demandam uma cadeia de frios de transporte e estocagem (91).

Como antivenenos são altamente específicos, neutralizando os efeitos do veneno que foi utilizado para produzi-lo, a produção de antiveneno poliespecífico ou polivalente é uma estratégia adotada em alguns locais. O apropriado antiveneno a ser utilizado no tratamento deve ser selecionado a partir da identificação da serpente. As indicações para a administração devem

levar em consideração as circunstâncias da mordida, o tempo decorrido entre o acidente e a admissão no hospital, sintomas locais e sistêmicos, evolução clínica, a disponibilidade de instalações médicas e acessibilidade a unidade de tratamento intensivo.

De qualquer forma, uma vez indicada a imunoterapia esta deve ser administrada o mais breve possível, e não deve ser excluída mesmo que haja decorrido um longo período entre o acidente ofídico e o atendimento médico-hospitalar (92). Estas mesmas considerações são utilizadas para estabelecer a dose. A dificuldade em se instituir a dose correta a ser administrada pode induzir a utilização de um excesso de anticorpos, algo perigoso pois proteínas estranhas podem provocar reações de hipersensibilidade.

As primeiras reações específicas não-antiveneno são hipersensibilidade do tipo I, proporcionais a quantidade de proteínas injetadas e aparecem poucos minutos depois da administração. A hipersensibilidade às proteínas do cavalo corresponde aos tipos III e IV, reações imediatas (menos que 12 horas) e tardias (1 a 3 semanas). Estas reações usualmente são benignas mas às vezes podem causar anafilaxia (19). Isto ocorre em consequência de que a maioria dos antivenenos possuem uma grande porção de imunoglobulinas que não são direcionadas contra os componentes (aproximadamente 70%) (93).

A incidência de todos os tipos de reações adversas, independente de sua natureza e intensidade são difíceis de estimar, no entanto, a incidência das reações adversas ao se utilizar fragmentos de IgG altamente purificadas é menor do quando se trata com antiveneno (94). Isso porque, ao se utilizar IgG total como antiveneno, uma elevada quantidade de proteínas é injetada e a fração Fc das IgG's ativam o sistema complemento resultando em efeitos adversos podendo induzir choque anafilactoíde (reações de hipersensibilidade em indivíduos que nunca receberam soro de cavalo) (19).

Infelizmente, os antivenenos disponíveis às vezes não protegem satisfatoriamente os pacientes. Uma das prováveis razões pode ser o fato de que o antiveneno produzido não possua anticorpos que possam reconhecer um componente tóxico específico presente no veneno da serpente ofensiva (43) (89). Isso ocorre porque as misturas de imunização usadas para produção de antiveneno são específicas para cada região ou país. Tal heterogeneidade inter e intraespecífica na composição do veneno pode também ser responsável por diferenças nos sintomas observados em vítimas humanas de envenenamento pela mesma espécie de serpente em diferentes regiões geográficas (17,18).

Uma abordagem no sentido de aprimorar a produção de antivenenos é a utilização de peptídeos sintéticos como antígenos (95). Os peptídeos, normalmente 10-20 resíduos de aminoácidos de comprimento, podem ser utilizados tão eficazmente como as proteínas para

induzir a produção de anticorpos policlonais e monoclonais. No entanto, quando peptídeos menores que 5 kDa são usados como antígenos, precisam ser conjugados covalentemente com uma proteína transportadora imunogênica maior (KLH - Keyhole limpet hemocyanin, BSA – Bovine Serum Albumin, etc.) antes da imunização para estimular as respostas de anticorpos (96).

Outra alternativa empregada para superar as características dos peptídeos e suas conseqüências farmacocinéticas, são os lipossomas que, além de proteger os peptídeos do meio ambiente, são veículos potentes para a entrega de antígenos às células apresentadoras de antígenos. Ademais, os lipossomas de vacinação regulam a distribuição, a retenção e o tráfego celular no local injetado (97).

Portanto, um desafio-chave para o desenvolvimento de novas abordagens para a imunoterapia de envenenamento por mordida de serpente é compreender a variação nos constituintes antigênicos dos venenos de serpentes de origens geográficas distintas (2).

Estudos de proteoma de venenos de serpentes (venômica) e transcriptomas de glândulas venenosas fornecem informações essenciais sobre a composição proteica do veneno e função inferida das proteínas, e permitem o desenvolvimento guiado de IgG's que visam apenas as proteínas mais tóxicas (3).

Desse modo, conhecer a composição de toxinas do veneno é de fundamental importância para o tratamento das vítimas de acidentes ofídicos, já que pode proporcionar a correta seleção do pool de venenos para produção dos antivenenos, permitir a obtenção de anticorpos específicos por meio da utilização das principais toxinas ou por utilização de peptídeos antigênicos, aprimorando a eficácia dos antivenenos e reduzindo a ocorrência de reações hipersensibilidade.

## 2 JUSTIFICATIVA

É um desafio para os médicos que tratam as vítimas de mordidas de serpentes determinarem as espécies responsáveis pelo envenenamento dificultando o tratamento com o antiveneno correto. Além disso, as diretrizes clínicas atuais recomendam a retenção da administração de antiveneno até que sintomas de envenenamento sejam detectados nos pacientes.

Tal situação aliada ao cenário do diagnóstico “*in vitro*” para acidentes ofídicos que vai de uma ausência de imunorreagentes específicos, àqueles com baixo nível de sensibilidade e ainda etapas de incubação prolongadas e a necessidade de equipamentos caros e instalações médicas, demonstram a fragilidade da conduta médica quanto ao tratamento correto das vítimas acidentadas.

Portanto, algo imprescindível para superar as dificuldades do diagnóstico e tratamento do ofidismo é o desenvolvimento de teste de diagnóstico específico, sensível, rápido, mas simples de executar, que requer estrutura e capacitação técnica mínimas, passos de incubação otimizados em temperatura ambiente e discriminação visual das densidades óticas entre a amostra e o controle. (65)

O método de aglutinação em lâmina (66) é uma eficiente alternativa para aprimorar o diagnóstico “*in vitro*” e o tratamento dos acidentes ofídicos, e ainda permitir a extração de dados epidemiológicos de número e distribuição de mordidas (67) que forneçam números para a produção e distribuição racional de antivenenos. O método de aglutinação em lâmina (66) é um teste simples e pode permitir alcançar a população rural, que possui a dificuldade usual de transporte até um centro médico (67).

Esta plataforma de aglutinação em lâmina envolve a sensibilização de partículas de látex com o anticorpo específico que ao entrar em contato com o antígeno promove uma rápida aglutinação, macroscopicamente visível (98).

Já no campo do tratamento do ofidismo, até hoje, os antivenenos configuram como única medida específica. Uma das ações necessárias para aprimorar os antivenenos é melhorar a qualidade e o tipo de venenos utilizados para a imunização. O veneno ideal para a preparação do antiveneno deveria conter um grande número de componentes com fraca toxicidade (99), de maneira a não causar intoxicação nos animais a serem imunizados a fim de preservar sua saúde, qualidade e tempode vida.

Adicionalmente, o uso de frações tóxicas isoladas pode enriquecer um veneno pobre em uma toxina individual, aumentar o título protetor do antiveneno e reduzir a quantidade de antiveneno administrado, evitando a formação de anticorpos contra proteínas não tóxicas (100).

Assim, como foi demonstrado que anticorpos anti-crotoxina são capazes de neutralizar a ação do veneno (101), antipeptídeos específicos produzidos a partir de uma diversidade de epítopos também podem apresentar esta habilidade, de forma que a dependência do veneno bruto e toxinas seria reduzida. Outro benefício também seria a redução da toxicidade para os animais imunizados uma vez que, o veneno bruto e todos seus componentes não seria injetado e poderia reduzir os sinais e sintomas da intoxicação.

Para tanto, é necessário utilizar anticorpos purificados que permitam o mapeamento de epítopos antigênicos, dos principais componentes do veneno, tornando a mistura de epítopos de diversas toxinas uma possibilidade na produção de antivenenos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral I - Utilização dos anticorpos anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* no mapeamento de epítopos lineares

- I. Mapear epítopos lineares com anticorpos imunopurificados anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops*, e produzir antipeptídeos neutralizantes da ação tóxica do veneno crotálico.

#### 3.1.2 Específicos I

- 1 Imunopurificar anticorpos anticrotálicos e antibotrópicos contra pool de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e de *C.d. terrificus*, e vice-versa;
- 2 Verificar a especificidade dos anticorpos imunopurificados anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops*;
- 3 Mapear, por Spot synthesis, epítopos lineares das principais toxinas do veneno de *C.d. terrificus* e *B. jararaca*;
- 4 Imunizar coelhos com lipossomas incorporados com epítopos previamente identificados;
- 5 Avaliar o reconhecimento dos antipeptídeos contra as toxinas e os epítopos de origem;
- 6 Avaliar ação neutralizante dos antipeptídeos sob a letalidade do veneno de *C.d. terrificus*;
- 7 Selecionar as partículas e o método de acoplamento com os anticorpos purificados;
- 8 Estabelecer o protocolo de execução do ensaio de aglutinação;
- 9 Avaliar a sensibilidade, especificidade, reatividade cruzada e efeito prozona do ensaio de aglutinação.

#### 3.2 Geral II - Utilização dos anticorpos purificados anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* no desenvolvimento de um método de aglutinação para diagnóstico “*in vitro*” dos venenos de *Bothrops* spp. e *C.d. terrificus*

- II. Desenvolver método de aglutinação para diagnóstico diferencial “*in vitro*”, dos venenos de *Bothrops* spp. e *C.d. terrificus* utilizando os anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops*.



### 3.2.1 Específicos II

- 10 Selecionar as partículas e o método de acoplamento com os anticorpos purificados;
- 11 Estabelecer o protocolo de execução do ensaio de aglutinação;
- 12 Avaliar a sensibilidade, especificidade, reatividade cruzada e efeito prozona do ensaio de aglutinação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais, veneno e antivenenos

Coelhos brancos, fêmeas, raça New Zealand, pesando 2 kg foram fornecidos pelas Fazenda da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Camundongos brancos, machos, raça Swiss, com peso entre 18 e 22 gramas foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os animais foram mantidos a uma temperatura de 25°C, em um ciclo claro/escuro de 12 horas e receberam comida e água “*ad libitum*”, sob condições ambientais controladas. Os protocolos experimentais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (145/2019-CETEA/UFMG).

Os venenos de *C.d. terrificus*, *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*), *B. jaracussu*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. atrox* e *Micrurus frontalis* (*M. frontalis*) foram gentilmente fornecidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, armazenados liofilizados a -20 ° C até o momento do uso. A crotamina e a crotoxina foram purificadas a partir do veneno de *C.d. terrificus* como descrito por Toyama MH *et al.* e Faune G; *et al.* (102,103) respectivamente, e mantidos congelados a -20 ° C, até seu uso. A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry (104).

Plasmas anticrotálicos e antibotrópicos de cavalos hiperimunes foram obtidos seguindo os esquemas de imunização padrão da Unidade de Produção de Imunobiológicos da FUNED (20).

## 4.2 Precipitação de imunoglobulinas

Para se obter anticorpos purificados, é necessário se proceder inicialmente a uma etapa de precipitação de IgG do plasma hiperimune de cavalo, pois o material biológico possui uma grande quantidade de proteínas que não são de interesse deste estudo. Ademais, não há ocorrência de sobrecarga das colunas de cromatografia e possível entupimento, pois parte das impurezas foram removidas pela precipitação.

Para tanto, antes de se iniciar a precipitação, é necessário remover a rede de fibrina, que se forma devido ao congelamento do plasma, por meio de centrifugação a 8000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante é filtrado, utilizando-se um papel de filtro onde ficará retido a fibrina formada.

Ao plasma filtrado, adicionou-se lentamente e sob homogeneização solução de sulfato de amônio supersaturado na relação 1:1 de plasma. À medida que se adiciona a solução de sulfato de amônio supersaturada ocorre a precipitação de imunoglobulina da classe G (IgG). A mistura é então armazenada por um período de 8 a 12 horas sob refrigeração.

Então, para separar o precipitado do sobrenadante é preciso executou-se uma centrifugação a 10.000 r.p.m por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante é descartado e o precipitado composto por IgG, é solubilizado utilizando-se PBS 50 mM pH 7,0 em igual volume ao de plasma.

Para retirar o sulfato de amônio residual, procedeu-se à diálise contra PBS 15 mM, durante 24 horas entre 2-8°C (105).

Ao final dessa etapa é necessário conduzir ensaio a fim de verificar a natureza da proteína precipitada.

## 4.3 Determinação da concentração de IgG

Estimou-se espectrofotometricamente A concentração de IgG de cavalo precipitada, imunopurificada ou não, utilizando-se o método de Warburg-Christian (106); na qual realiza-se a leitura da solução proteica em 280 e 260 nm e aplica-se a fórmula  $(1,55 \times \text{Absorbância em } 280 \text{ nm}) - (0,76 \times \text{Absorbância em } 260 \text{ nm})$ ; que resultará na concentração expressa em mg/mL.

Utilizou-se uma solução de cloreto de sódio na concentração de 0,85% como branco da leitura, sendo a mesma utilizada para diluir a IgG de maneira a atender o limite superior de leitura do espectrofotômetro.

#### 4.4 SDS-PAGE

Para verificar a composição das proteínas precipitadas de plasma de cavalo, imunizado com veneno de *C.d. terrificus*, e posteriormente imunopurificadas ou não, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) em condições redutoras e não redutoras, de acordo com o método de Laemmli (107). Corou-se o gel com Coomassie Blue R-250. Os marcadores de peso molecular foram incluídos nas corridas eletroforéticas.

Posteriormente, para avaliar a composição do material precipitado do plasma de cavalo imunizado com pool de venenos do gênero *Bothrops*, após os processos de imunopurificação, procedeu-se ao SDS PAGE apenas na condição não reduzida.

#### 4.5 Purificação de anticorpos por cromatografia por imunoafinidade

Preparou-se duas colunas de afinidade contendo Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio Cat. 17030, Lote 10245538, Marca: GE Healthcare. A primeira contendo veneno de *C.d. terrificus* e a segunda contendo mistura de veneno de serpentes *B. atrox* (10%), *B. alternatus* (12,5%), *B. neuwiedi* (12,5%), *B. jararaca* (40%), *B. jararacussu* (12,5%) e *B. moojeni* (12,5%). Todos os venenos foram gentilmente fornecidos pela FUNED, armazenados liofilizados a -20 ° C até o momento do uso.

Para preparar a coluna, é necessário inchar a resina com HCl 1mM, aguardar sua hidratação por 15 minutos e após centrifugação por 15 minutos a 11.000 r.p.m, descarta-se o sobrenadante e repete-se novamente as mesmas etapas. Ao sedimento, se adiciona tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8,3; centrifuga-se por 10 minutos a 11000 r.p.m. O sobrenadante é parcialmente descartado e a um restante de 5 mL adiciona-se o veneno que se ligará a resina. Homogeneizar e armazenar over-night entre 2-8°C.

Após o acoplamento, determinou-se a concentração de proteína no sobrenadante pelo método de Lowry (104). Então, o bloqueio é realizado com glicina 200 mM pH 2,8 por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação.

Em seguida, centrifugou-se a 11.000 r.p.m por 10 minutos e após descarte, transferiu-se a resina para uma coluna onde se procedeu à 5 lavagens, alternando-se tampão acetato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 500 mM pH 4,0 e tampão bicarbonato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 500 mM pH 8,3. Para finalizar, a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4. A coluna na qual a resina foi acoplada à veneno de *C.d. terrificus* foi mantida com

PBS 50 mM e azida sódica 14,6 mM e a coluna contendo pool de venenos do gênero *Bothrops* foi acondicionada com PBS 50 mM, fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 2 mM (Cat. P7626 Sigma); ditioneitol (DTT) 1 μM (Cat. 171318-02 GE), e EDTA dissódico 1mM (Cat. E5134 Sigma) para inibir a proteólise do veneno. Ambas as colunas foram armazenadas entre 2-8°C.

A fração de IgG's precipitadas do plasma anticrotálico foram primeiramente incubadas na coluna Sepharose-veneno crotálico. Na sequência drenou-se a coluna, aplicou-se volume adequado de IgG, permitiu-se que a solução de imunoglobulina recirculasse por 4 vezes na coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com PBS. Então, para eluir os anticorpos que se ligaram à coluna, utilizou-se tampão glicina 100 mM, cloreto de sódio 500 mM, pH 2,8. Em tubos eppendorf de 1,5 mL, contendo Tris 1 M pH 9,0, foi recolhido o eluato em quantidade suficiente para alcançar pH 7,0 na solução final. A concentração de IgG foi determinada espectrofotometricamente. Na sequência, o eluato foi incubado na segunda coluna Sepharose-veneno botrópico para remover possíveis anticorpos capazes de reconhecer proteínas deste pool de venenos das principais espécies deste gênero, e o que não se ligou, foi recolhido.

Para imunopurificar as IgG's do plasma antibotrópico o procedimento descrito acima foi realizado, porém a primeira coluna possuía pool de venenos do gênero *Bothrops* acoplado à resina e a segunda coluna possuía veneno de *C. d. terrificus*.

Na sequência, os anticorpos imunopurificados denominados então de anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* foram dialisados contra PBS 15 mM, over night entre 2-8°C. Posteriormente, as soluções foram concentradas utilizando-se o sistema Amicon®, filtro de 30 μm e a concentração de IgG estimada pelo método de Warburg e Christian (106). Os anticorpos foram armazenados a -20°C até sua utilização.

#### 4.6 Imunoensaios - ELISA Indireto

Ensaio de ELISA indireto foram realizados para avaliar se os anticorpos obtidos do plasma anticrotálico, após o processo de purificação tinham especificidade contra veneno de *C.d. terrificus* e reduzida reatividade cruzada contra veneno de espécies de *Bothrops*. O mesmo método foi empregado para verificar a especificidade dos anticorpos oriundos de plasma antibotrópico e sua reatividade cruzada contra veneno de *C. d. terrificus*.

Uma microplaca de ELISA de 96 poços foi sensibilizada “over night” a 4° C com 100 μL de uma solução contendo 0,5 μg/mL de veneno de *C.d. terrificus* e outra com 0,5 μg/mL de pool de venenos de *Bothrops* (50% *B. jararaca*, 12,5% *B. alternatus*, 12,5% *B. jararacussu*, 12,5% *B. moojeni* e 12,5% *B. newviedi*). Ambos os venenos foram diluídos em bicarbonato de

sódio/tampão carbonato de sódio 62,5 mM pH 9,6. Após a sensibilização, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de PBS-Tween a 0,01% e bloqueadas com solução de PBS-Tween a 0,01% contendo albumina bovina (1%), durante uma hora a 37°C. Ao final do bloqueio as placas foram novamente lavadas. Os anticorpos de cavalo anti-*C.d. terrificus*, IgG de plasma de cavalo imunizado com veneno de *C.d. terrificus* (IgG anticrotática) foram ensaiados em três diferentes concentrações: 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL e IgG de plasma de cavalo não imune (controle) ensaiados em três diferentes concentrações: 1,0; 5,0 e 10 µg/mL, todos os anticorpos foram diluídos em tampão de incubação (PBS-Tween 0,01%, albumina bovina a 0,1%) e incubados durante 1 hora a 37°C.

As placas foram lavadas quatro vezes com solução de PBS-Tween a 0,01% e incubadas com 100 µL de anticorpos de ovelha anti-cavalo conjugados à enzima peroxidase, diluídos 1:16000, durante 1 hora a 37°C. A ligação dos anticorpos aos antígenos, que estão adsorvidos na placa, foi inferida usando o substrato ortofenilenodiamina (OPD), Cat. P9187, Sigma-Aldrich. Após 30 minutos de incubação, interrompeu-se a reação adicionando-se 25 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20 em água deionizada. As absorbâncias foram lidas em 490 nm. Os valores obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism 7 (108) considerando um  $p < 0,05$ .

Para ensaiar os anticorpos antibotrópicos, uma microplaca ELISA de 96 poços foi sensibilizada “*over night*” a 4° C com 100 µL de uma solução contendo 1 µg/mL de veneno de *C.d. terrificus* e outra com 1 µg/mL de pool de venenos de *Bothrops* (conforme descrito acima). Os anticorpos anti-*Bothrops*, IgG de plasma de cavalo imunizado com pool de venenos de *Bothrops* (IgG antibotrópica) e IgG de plasma de cavalo não-imune (controle) foram ensaiados nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5,0 µg/mL.

## **4.7 Mapeamento de epitopos e síntese dos peptídeos solúveis correspondentes**

### **4.7.1 Ligação dos anticorpos anti- *C.d. terrificus* aos peptídeos presentes na membrana**

Foram preparados em membrana de celulose por Spot síntese (109), conjuntos de pentadeca-peptídeos sobrepostos após deslocamento de três resíduos, correspondentes à sequência de aminoácidos de: Crotamina código Uniprot Q9PWF3, PLA2 código Uniprot P62022, Giroxina código Uniprot Q58G94 e vNGF (venom Nerve Growth Factor) código Uniprot Q9DEZ9. As membranas foram obtidas de Intavis (Koln, Alemanha) e os aminoácidos F-moc da Merck e Sigma. Foi utilizado um robô Multipep para síntese dos peptídeos.

Após uma etapa de saturação de 12 horas com tampão de bloqueio (3,0 g de sacarose, 1 g de albumina bovina em 50 ml de TBS-Tween 20 a 0,1%), o conjunto de peptídeos ligados à membrana foi avaliado, separadamente e por incubação com: 1- Controle - IgG de cavalo não imune; 2 - anti-*C.d. terrificus* (IgG anti- *Crotalus* que foi imunopurificado contra o veneno de *C.d. terrificus* e pool de venenos do gênero *Bothrops*), ambas as imunoglobulinas foram ensaiadas na concentração de 35 µg/mL; e 3-plasma anticrotálico de cavalo diluído 1:1000 em tampão de incubação. Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, a membrana foi lavada e incubada durante 1 h à temperatura ambiente com um anticorpo anti-cavalo de ovelha conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:3000 (Ref. A6063 - Sigma) em tampão de incubação. Após duas lavagens com TBS-Tween 20 a 0,01% e duas de CBS pH 7 (8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 2,1 g/L de ácido cítrico mono-hidratado) os “spots” foram revelados depois de 30 minutos de incubação com 180 µL de MTT (brometo tetrazólio azul de tiazolil), 150 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e 120 MgCl<sub>2</sub> em 30 mL de CBS.

As membranas foram regeneradas após seu uso por tratamento com dimetilformamida, uréia 8M e 10% de ácido acético em etanol para remover o corante precipitado e moléculas ligadas aos peptídeos.

#### **4.7.2 Ligação dos anticorpos anti- *Bothrops* aos peptídeos presentes na membrana**

Foram preparados em membrana de celulose por Spot síntese (109), conjuntos de pentadecapeptídeos sobrepostos, após deslocamento de três resíduos correspondentes à sequência de aminoácidos de: Zinco Metaloprotease código Uniprot O93523, Serino Protease código Uniprot Q9PTU8, SNACLEC Botrocetina alfa Uniprot P22029, SNACLEC Botrocetina beta código Uniprot P22030, Potencializador de bradicinina, peptídeo natriurético código Uniprot Q6LEM5 e Fosfolipase ácida A2 código Uniprot P81243. As membranas foram obtidas de Intavis (Köln, Alemanha) e os aminoácidos F-moc de Merck e Sigma. Foi utilizado um robô Multipep para síntese dos peptídeos.

Após uma etapa de saturação de 12 horas com tampão de bloqueio (3,0 g de sacarose, 1 g de albumina bovina em 50 ml de TBS-Tween 20 a 0,1%), o conjunto de peptídeos ligados à membrana foi avaliado, separadamente e por incubação com: 1- IgG de cavalo não imune (denominada Controle); 2- IgG anti-*Bothrops* imunopurificado contra pool de venenos de *Bothrops* e veneno de *C.d. terrificus* (denominada anti-*Bothrops*); 3- IgG de plasma de cavalo imunizado com pool de venenos de *Bothrops* (denominada IgG anti-botrópica); todas as imunoglobulinas foram ensaiadas na concentração de 35 µg/mL. Após 90 minutos de incubação

à temperatura ambiente, a membrana foi lavada e incubada durante 1 h à temperatura ambiente com um anticorpo anti-cavalo de ovelha conjugado com fosfatase alcalina (Ref. Sigma A6063, diluído 1 : 3000). Após duas lavagens com TBS-T e duas de CBS pH 7 (8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 2,1 g/L de ácido cítrico mono-hidratado) os “spots” foram revelados depois de 30 minutos de incubação.

As membranas foram regeneradas após seu uso por tratamento com dimetilformamida, uréia 8M e 10% de ácido acético em etanol para remover o corante precipitado e moléculas ligadas aos peptídeos.

### 4.7.3 ImageJ

Para medir as intensidades das reações nos ‘spots’, utilizou-se o software de programa de processamento de imagem Java, ImageJ. Este possui recurso para calcular dados de área e valor de pixel de região previamente selecionada pelo usuário.

As imagens foram analisadas no modo 8 bits, de maneira que a membrana estará em escala de cinza, em seguida seleciona-se Inverter as cores. Depois disso, foi possível classificar as zonas reativas com uma pontuação maior do que as não-reativas. Em seguida, subtraiu-se o “background”. Selecionou-se a área, pressionou-se "Ctrl M" para medir os pixels na área delimitada. A "Média" é o valor a utilizado para determinar a reatividade do spot.

### 4.7.4 Modelagem molecular, localização tridimensional de epitopos lineares e alinhamento

Os peptídeos mais reativos, identificados na membrana de Spot de proteínas do veneno de *C.d. terrificus*, considerados essenciais para o reconhecimento de anticorpos, e sintetizados na forma solúvel, foram localizados espacialmente nos modelos tridimensionais das respectivas proteínas. As estruturas utilizadas de Crotamina e PLA2 foram respectivamente PDB 4GV5 e 2QG3.

Já os epitopos de metaloprotease código Uniprot O93523, identificados com anti-*Bothrops* foram localizados espacialmente no modelo tridimensional código PDB 3DSL.

As localizações dos epitopos foram identificadas usando o PyMOL Molecular Graphics System (110).

Para verificar a existência ou não de regiões conservadas e nível de identidade, as sequências de toxinas de *C.d. terrificus* com as do gênero *Bothrops*, e de *B. jararaca* com

toxinas de veneno de *C.d. terrificus*, foram alinhadas aplicando-se a ferramenta Blast (111), na configuração “default”.

#### 4.7.5 Síntese de peptídeos solúveis

Quatro peptídeos identificados como epítomos, a partir do imunoenensaio de Spot synthesis com o anti-*C.d. terrificus*, foram sintetizados em fase sólida, resina (SPPS), que usa aminoácidos especiais para síntese “*in vitro*” (112).

Cada peptídeo sintetizado, pertencente à crotamina e crotoxina B, contém 21 resíduos com base na sequência do Spot anterior e posterior àquele com a maior contagem de pixels, obtidos no ensaio de Spot com o anti-*C.d. terrificus*. De acordo com a análise dos resultados do ensaio dos peptídeos ligados à membrana celulose, quatro sequências foram identificadas como principais epítomos e foram selecionadas para serem sintetizadas na forma solúvel: F<sup>12</sup>PKEKICLPPSSDFGKMDCRW<sup>32</sup> de crotamina (código Q9PWF3) denominado Crotam1; L<sup>10</sup>LVGVEGHLLQFNKMIKFETR<sup>30</sup>; Y<sup>43</sup>CGWGGRGRPKDATDRCCFVH<sup>63</sup> e T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCRGPSETC<sup>138</sup> de crotoxina B (código P62022), nomeados, respectivamente, Ctx2, Ctx3 e Ctx4. Todos os peptídeos foram preparados por síntese utilizando o grupamento Fmoc imobilizado numa resina Rink Amida (Novabiochem). Os aminoácidos foram adquiridos da Sigma Aldrich e as etapas de acoplamento foram realizadas usando um robô ResPep (Intavis), conforme descrito por (113). Os peptídeos foram acetilados no N-terminal e amidados no C-terminal durante a síntese.

Os aminoácidos utilizados na síntese possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à fase sólida que também se encontra protegida. O protocolo foi executado conforme Merrifield (114).

A massa molecular e ponto isoelétrico dos peptídeos foram calculados utilizando a ferramenta de bioinformática ProtParam disponível em <http://web.expasy.org/protparam/>.

Para a síntese de cada peptídeo utilizou-se 40 mg da resina (Rink Amide-40 µM) em um tubo de síntese e o seu grupamento Fmoc liberado com DMF (Dimetilformamida). Após sua remoção há duas adições de 25% de piperidina em DMF. Então, a resina foi lavada três vezes por 30 segundos com DMF e uma vez por 30 segundos com DCM (Diclorometano).

Inicia-se, então, o acoplamento dos aminoácidos com o grupamento amino protegido pelo Fmoc. O primeiro aminoácido a ser acoplado é ligado pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amina da resina, formando uma ligação peptídica.



No final da síntese, as resinas, foram transferidas para quatro tubos contendo solução de clivagem 95% de TFA (ácido trifluoroacético; 2,5% de TIPS (tri-isopropil silano) e 2,5% de água deionizada). Os tubos de reação ficaram agitando com esta solução por 3 horas.

As resinas novamente foram transferidas para as seringas onde ocorreu a síntese, drenadas e as soluções com os peptídeos recolhidas em tubos. Os produtos foram precipitados com éter gelado overnight a 4°C. O tubo foi lavado e centrifugado três vezes a 5000 r.p.m por 20 minutos, enquanto o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspensionado em solução de água e TFA 0,1%.

As massas moleculares de Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4 foram confirmadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF), modo linear.

#### **4.7.6 Preparação de lipossomas e incorporação de peptídeos**

Os quatro peptídeos sintéticos foram encapsulados em lipossomas usando o método de congelamento (115). Resumidamente, vesículas multi-lamelares (MLVs) foram preparadas usando uma mistura de 24,05 mg de L- $\alpha$ -lecitina de soja (Cat. 429415 - Sigma) e 9,8 mg de colesterol (Cat. C8667, Sigma) dissolvidos em 10 mL de clorofórmio (Cat. FMA00001130101000 - FMAIA), concentração lipídica final de 3,4 g/L.

A mistura lipídica é adicionada a um balão de fundo redondo de 50 mL com um gargalo de extensão longa e o solvente é removido sob reduzida pressão por meio de um rotaevaporador (Marca: Quimis) e sob aquecimento a 40°C. O filme lipídico foi hidratado com 2 mL de PBS (NaCl 0,15 M, fosfato 0,01 M, pH 7,2) contendo 500  $\mu$ g de cada peptídeo solúvel. A mistura foi agitada no vórtex e a suspensão foi congelada em nitrogênio líquido -80 ° C e depois descongelada em banho-maria mantido a 40 ° C. Ambos os últimos passos são repetidos cinco vezes (115).

Os lipossomas foram diluídos 1:2 com adjuvante selecionado, que foi hidróxido de alumínio 4% (Suspensão oral -Laboratório EMS).

#### **4.7.7 Protocolo de imunização**

Para se alcançar a produção de anticorpos anti-peptídeos ciclos de imunização foram realizados em 2 grupos de 2 coelhos cada, totalizando 4 animais.

O primeiro grupo era composto por um animal que foi imunizado com lipossomas incorporados com a mistura dos quatro peptídeos solúveis e; animal controle, o qual foi

imunizado apenas com lipossomas. Este grupo recebeu um total de sete doses de reforço com intervalo de 15 dias entre cada imunização.

Ao final deste período, o sangue foi coletado dos dois animais e imunoenaios (ELISA indireto), bem como ensaios de neutralização foram conduzidos.

Sequencialmente, para se confirmar os resultados obtidos com o grupo 1, ampliou-se os estudos após a formação do grupo 2 composto por 2 coelhos. Em ambos os animais, foram injetados lipossomas incorporados com os peptídeos solúveis, submetidos a nove ciclos de imunização, com intervalo de 15 dias entre sí. Ao se completar os ciclos de imunização, os mesmos ensaios realizados com as amostras do grupo 1 foram conduzidos para o grupo 2.

Em cada ciclo de imunização, cada animal recebeu 2 mL de lipossomas diluídos com hidróxido de alumínio 4%, dividido em injeções de 1 mL cada, aplicadas em dois pontos distintos do dorso, por via subcutânea. Os coelhos 1,2 e 3 foram imunizados com 250 µg de cada peptídeo, perfazendo um total de 1000 µg de peptídeos por imunização. O coelho controle foi submetido aos mesmos volumes e via de aplicação, porém recebeu apenas doses de lipossomas com o adjuvante mencionado, sem peptídeos.

#### **4.7.8 Reatividade e especificidade dos anti-peptídeos**

Para avaliar se os anti-peptídeos produzidos em coelhos possuíam habilidade de reconhecerem os antígenos que lhes deram origem, assim como as proteínas crotamina e crotoxina purificadas ou presentes no veneno de *C.d. terrificus*, ensaios de ELISA indireto foram executados.

Placas de ELISA (High binding Cat. 3590 - Costar) foram revestidas com veneno de *C.d. terrificus* (5 µg/mL), crotamina (5 µg/mL) ou crotoxina (5 µg / mL) diluídos em tampão de sensibilização (bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) e armazenadas *overnight* entre 2-8 °C. Posteriormente, após 4 ciclos de lavagens, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de Tween 20.

Ao final do bloqueio as placas foram novamente lavadas, adicionadas de 100 µL de anticorpos anti-*C.d. terrificus* (2,5 µg/mL), de soro de coelho imunizado 1, 2, 3 (anti-peptídeos 1, 2, 3) ou de soro do coelho controle diluídos 1:100 em tampão de incubação (PBS-Tween 0,01%, albumina bovina a 0,1%) e incubados durante 1 hora a 37°C. Após quatro lavagens com solução de PBS-Tween a 0,01% foram adicionados aos poços 100 µL de IgG de ovelha anti-cavalo conjugado à peroxidase (1: 16000) ou IgG de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (1: 10000) (ambos Sigma-Aldrich) e incubados por 1 hora a 37°C.

Após 4 ciclos de lavagem, adicionou-se 100 µL em cada poço de substrato OPD (Cat. P1526 Sigma-Aldrich) para detectar a reação. Após 30 minutos de incubação, interrompeu-se a reação adicionando-se 25 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20 em água deionizada. As absorvâncias foram lidas em 490 nm.

Para demonstrar a especificidade dos antipeptídeos, placas de ELISA foram revestidas com os peptídeos Crotam1 (10 µg/mL), Ctx2 (10 µg/mL), Ctx3 (10 µg/mL) ou Ctx4 (10 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37° C.

Após etapas de lavagem e bloqueio conforme descrição acima, adicionou-se 100 µL do soro do coelho 1 diluído de 1: 100 até 1: 3200, ou soro do coelho controle diluído 1: 100 em tampão de incubação, e armazenou-se por uma hora a 37° C.

Na sequência, lavagens foram executadas e 100 µL de IgG de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (1: 10000) (Sigma-Aldrich) foram adicionados. Para detectar a reação 100 µL de substrato OPD (Cat. P1526 Sigma-Aldrich) foram utilizados. Após 30 minutos de incubação, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico diluído 1:20 em água deionizada. As absorvâncias foram lidas em 490 nm.

#### **4.7.9 Determinação da DL50 do veneno de *C.d. terrificus***

A toxicidade do veneno de *C.d. terrificus* injetado intraperitonealmente (i.p.) foi avaliada utilizando-se 4 grupos de seis camundongos, Swiss, machos pesando entre 18 e 22 g. Aplicou-se intraperitonealmente 100 µL de solução contendo 2,0, 2,8 ou 3,92 µg de veneno em PBS. Os animais sobreviventes foram contabilizados 12, 24 e 48 horas após a injeção i.p (116).

#### **4.7.10 Ensaio de neutralização**

A fim de avaliar a neutralização da letalidade do veneno de *C.d. terrificus* em camundongos, oito grupos de seis animais foram utilizados. Cada camundongo recebeu soros dos coelhos imunizados 1, 2 ou 3 diluídos 1:2 ou 1:4 em uma solução contendo 7 LD50 de veneno de *C.d. de terrificus* em PBS, ou soro do coelho 4 (controle) adicionado de 7 DL50. Todas as preparações foram pré-incubadas por 1 h a 37 ° C.

Após a injeção por via intraperitoneal de 200 µL das soluções, os animais foram observados durante 48 horas após a injeção. Após esse período, as mortes foram contadas.

## 4.8 Desenvolvimento de metodologia para diagnóstico “*in vitro*”

### 4.8.1 Sensibilização das partículas de latex

Partículas de poliestireno, de diâmetros selecionados, foram adquiridas do fornecedor Ikerlat.

A partir da construção de uma planilha que contempla o tipo de ligação, concentração do estoque de partículas expresso em percentual, peso molecular e concentração das proteínas a serem acopladas, proporções utilizadas entre as proteínas no acoplamento, diâmetro em  $\mu\text{m}$  das partículas, percentual desejável de revestimento, concentração final das partículas, e volume final da suspensão é possível, por cálculo, estimar a quantidade necessária de proteínas para determinado volume e concentração de partículas para se obter o revestimento planejado.

Para revestir as partículas, estas foram incubadas, “*over night*” sob agitação em temperatura ambiente, com volume determinado previamente, a partir de concentração conhecida, de anti-*C.d. terrificus* e proteína não relacionada em tampão de acoplamento\*. Após referido período, a suspensão de latex é bloqueada com tampão contendo BSA a 1% e homogeneizada durante 1 hora em temperatura ambiente. Alguns dados de formulação dos tampões foram omitidos pois se trata de informações estratégicas para obtenção da suspensão.

Na sequência, as partículas são centrifugadas durante 15 minutos a 13.000 r.p.m, o sobrenadante é descartado, as microesferas são ressuspendidas em tampão de lavagem contendo Tris 50 mM e azida sódica 14,6 mM, e sonicadas em potência de 80 Hz por três ciclos de 10 segundos.

As partículas são lavadas por mais 2 vezes. No final, as microesferas são armazenadas entre 2-8°C em tampão de estocagem.

Para acoplar os anticorpos anti-*Bothrops* as mesmas etapas foram conduzidas.

### 4.8.2 Ensaio de aglutinação

Para proceder ao ensaio, definiu-se que a relação entre suspensão de partículas e amostra seria 1:1. Sendo assim, colocou-se no centro do círculo de fundo negro, de uma lâmina de plástico, 35  $\mu\text{L}$  da suspensão de látex previamente homogeneizada. Na sequência, adicionou-se 35  $\mu\text{L}$  da amostra a ser avaliada ao lado da suspensão de látex.

Com um palito de plástico, homogeneizou-se a suspensão e a amostra. Imediatamente, o cronômetro foi disparado. Inclinou-se a lâmina para frente e para trás, com movimentos oscilatórios em vários planos.

Inspeções visuais foram realizadas desde 30 segundos até 8 minutos, com auxílio de uma fonte luminosa, verificando a presença ou não de aglutinação macroscópica, comparando com a aparência observada da amostra negativa, sempre conduzida concomitante com a amostra a ser investigada. Para realizar a interpretação do ensaio, por inspeção visual, definiu-se como marco de tempo 6 minutos.

Para conduzir a avaliação de sensibilidade e de especificidade das partículas, é necessário preparar amostras de soro contendo veneno em concentração conhecidas. Para tanto, colheu-se amostra de sangue, de voluntário que sabidamente nunca sofreu acidente ofídico. Após centrifugação a 4000 r.p.m por 10 minutos, o soro foi dividido em quatro porções: à primeira, adicionou-se diversas quantidades de veneno de *C.d. terrificus* almejando-se concentrações finais de 8 a 5000 ng/mL. À segunda acrescentou-se quantidades distintas de veneno *B. jararaca* para obter-se amostras com concentração de 2,74 a 3000 ng/mL. A adição de veneno de *M. frontalis*, à terceira parte, foi realizada para se obter uma concentração máxima de 2000 ng/mL. Já a quarta parte foi mantida sem modificações e considerada o controle negativo da reação. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

Para confirmar a ausência de aglutinação inespecífica, diversas amostras de sangue foram colhidas de doadores voluntários negativos para a presença de venenos de serpentes. Todos os doadores assinaram termo de doação voluntária.

Para interpretar a reação, considera-se que, quando a suspensão é homogênea e semelhante ao padrão obtido com a amostra negativa, e, portanto, não contém veneno de *C.d. terrificus* ou de *B. jararaca* ou *M. frontalis*. No entanto, quando há aglutinação macroscópica que varia desde aspecto rugoso da suspensão até grumos grosseiros, caracteriza-se uma amostra positiva para a presença de algum dos venenos. Porém, se a amostra é sabidamente negativa, considera-se a ocorrência de aglutinação inespecífica e portanto, falso-negativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Imunopurificação dos anticorpos anticrotáticos e antibotrópicos contra pool de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e de *C.d. terrificus*, e vice-versa

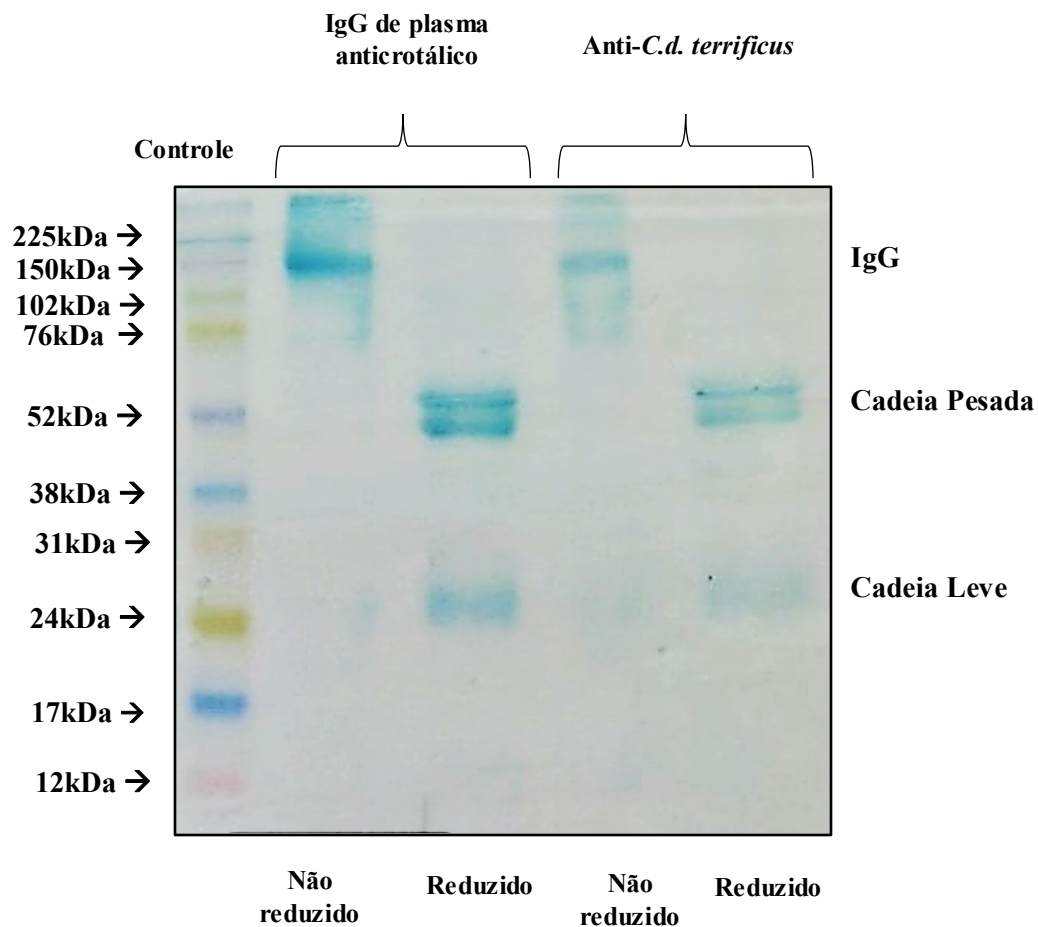
Mediante a precipitação de IgG's de plasma equino para a retirada de excesso de proteínas, foi possível conduzir as cromatografias por imunoafinidade do material precipitado de plasma anticrotático e antibotrópico. Dessa forma, não houve sobrecarga das colunas de cromatografia e as imunopurificações foram otimizadas.

As IgG's de plasma anticrotático foram aplicadas em uma coluna contendo veneno de *C.d. terrificus*, após eluição daqueles anticorpos que se ligaram, o material recolhido foi purificado em uma segunda coluna contendo venenos do gênero *Bothrops*. O material que não se ligou foi recolhido. O mesmo procedimento foi executado para IgG's de plasma antibotrópico, porém com inversão da sequência das colunas.

De posse de ambos os materiais imunopurificados em duas colunas, foi realizado um gel SDS PAGE para verificar a natureza dos componentes.

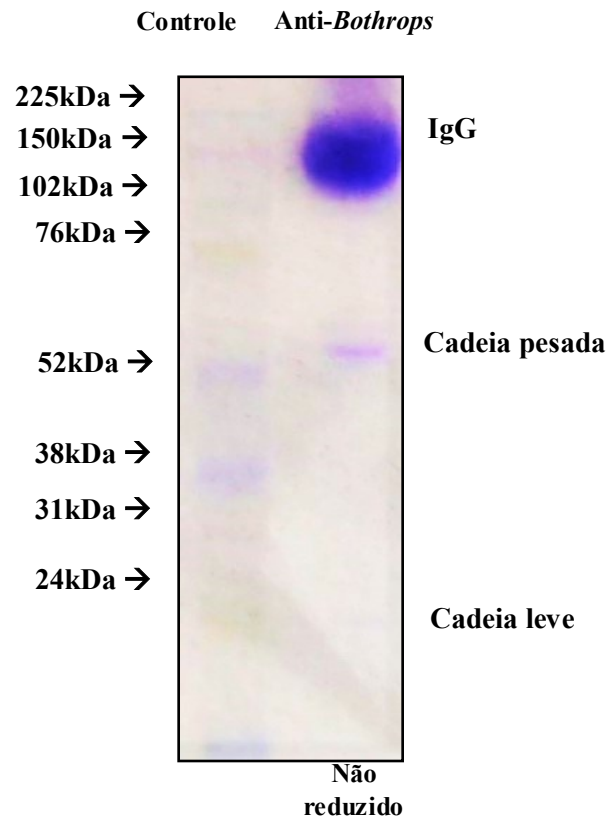
Realizou-se então a eletroforese de IgG de plasma anticrotático, antes e depois de proceder à purificação contra veneno de *C.d. terrificus* e pool de venenos do gênero *Bothrops* (Figura 6). A precipitação de IgG de plasma antibotrópico de cavalo também foi realizada, e a eletroforese foi conduzida apenas para o anticorpo que foi imunopurificado contra pool de venenos do gênero *Bothrops* e de *C.d. terrificus* (Figura 7).

**Figura 6 - Perfil eletroforético de IgG anticrotálica e anti-*C.d. terrificus* sobre condições redutoras e não redutoras. As proteínas foram coradas com Coomassie.**



A análise do SDS-PAGE em condições não redutoras revelou apenas uma banda tanto para a IgG de plasma anticrotálico quanto anti-*Bothrops*, que condiz com uma proteína que migrou com um peso de 150 kDa compatível com imunoglobulina G (17) (Figuras 6 e 7). Na condição redutora, a amostra oriunda da precipitação de plasma anticrotálico, duas bandas migraram correspondentes a 25 kDa e 50 kDa, pesos relacionados com as cadeias leve e pesada de anticorpos (18), conforme evidenciado na Figura 6.

**Figura 7 - Perfil eletroforético de Anti-*Bothrops* sobre condições não redutoras.** As proteínas foram coradas com Coomassie.



Portanto, considera-se que do processo de precipitação obteve-se apenas IgG, o que reduziu a quantidade de proteína aplicada nas colunas de afinidade.

O processo de imunopurificação então foi realizado a fim de se remover anticorpos que não eram antiveneno, obter anticorpos de elevada especificidade e de reduzida reatividade cruzada contra os venenos da segunda coluna ao qual foram purificados, atributos do anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* que ainda precisavam ser caracterizados.

## **5.2 Verificação da especificidade dos anticorpos imunopurificados anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops***

Para verificar a eficiência dos anticorpos em reconhecer veneno de *C.d. terrificus*, anti-*C.d. terrificus* e IgG anticrotálica, foram submetidos a um ensaio de ELISA indireto, no qual várias concentrações de ambos os anticorpos foram ensaiadas contra veneno de *C.d. terrificus* acoplado à microplaca na concentração de 0,5 µg/mL.

Para investigar se houve redução de reatividade cruzada após o processo de imunopurificação, diversas concentrações de ambos os anticorpos foram testadas contra pool



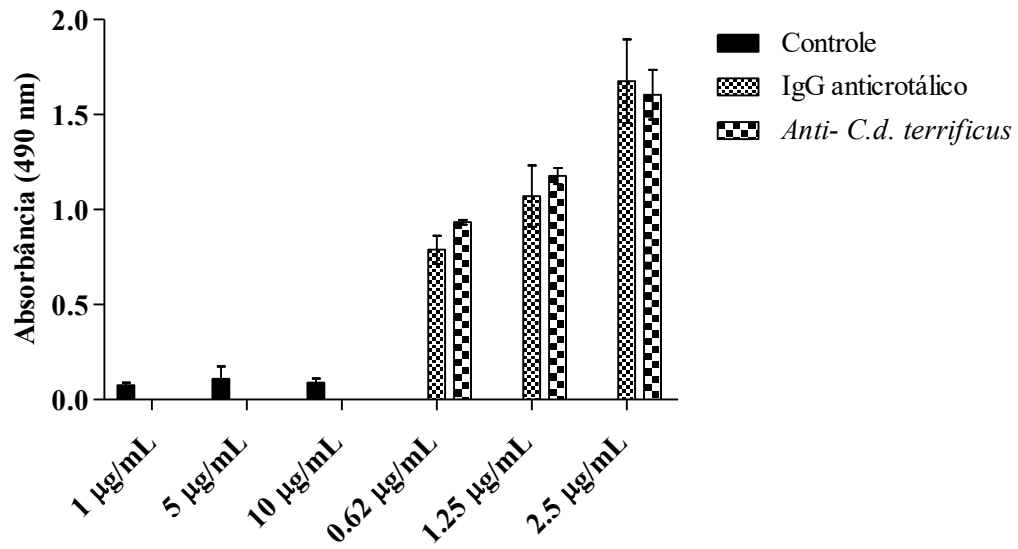
de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, imobilizado na placa na concentração de 0,5 µg/mL.

Na figura 8, há uma sobreposição das absorbâncias indicando que ambos os anticorpos tem capacidade similar de reconhecimento do veneno de *C.d. terrificus*. A análise estatística entre anti-*C.d. terrificus* e IgG anticrotática demonstrou que ambos possuem capacidades semelhantes de ligação ao veneno de *C.d. terrificus* ( $p > 0,05$ ). Na figura 9, pode-se constatar que tanto IgG anticrotática quanto anti- *C.d. terrificus* são capazes de se ligar ao pool de veneno de *Bothrops*, porém com intensidades distintas. Ao utilizar concentração de 2,5 µg/mL de ambos os anticorpos, houve redução na absorbância de  $1,6 \pm 0,09$  (média  $\pm$  desvio padrão) usando IgG anticrotática para  $0,92 \pm 0,03$  usando anti- *C.d. terrificus*, representando uma redução de aproximadamente 50% na reatividade cruzada. A mesma tendência foi observada quando se utilizou 1,25 µg/mL e 0,62 µg/mL de IgG anticrotática e anti- *C.d. terrificus*, onde constatou-se redução da absorbância de  $1,18 \pm 0,03$  para  $0,57 \pm 0,03$  e  $0,93 \pm 0,01$  para  $0,38 \pm 0,02$ , respectivamente (Figura 9). Nas três concentrações avaliadas demonstrou-se que o reconhecimento de ambas as amostras ao pool de venenos do gênero *Bothrops* são estatisticamente distintas entre si ( $***p < 0,001$ ).

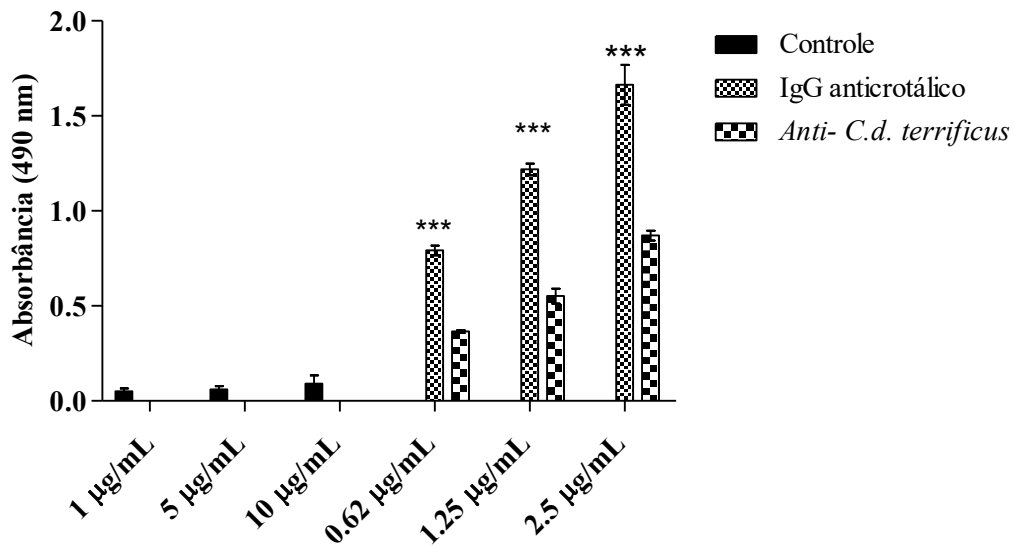
Portanto, as imunopurificações não comprometeram a eficiência de reconhecimento do anti-*C.d. terrificus* em comparação com a IgG anticrotática, mas a reatividade cruzada foi minimizada contra o pool de venenos de várias espécies de *Bothrops*.

A amostra controle, IgG de plasma de cavalo não immune, avaliada nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL ou 10 µg/mL, não foi capaz de se ligar tanto ao veneno de *C.d. terrificus* ou pool de venenos do gênero *Bothrops* imobilizados na placa na concentração de 0,5 µg/mL (Figuras 8 e 9).

**Figura 8 - ELISA indireto, ligação de IgG anticrotática e anti-*C.d. terrificus* ao veneno de *C.d. terrificus*.** A microplaca foi sensibilizada com 0,5 µg/mL de veneno de *C.d. terrificus* e ensaiada com concentrações crescentes (0,62; 1,25 e 2,5 µg/mL) de anti-*C.d. terrificus*, IgG anticrotática e IgG de cavalo não imune. A capacidade de ligação de anti-*C.d. terrificus* não é diferente da capacidade de ligação de IgG anticrotática ao veneno de *C.d. terrificus* ( $p > 0.05$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão da absorbância em 490 nm.

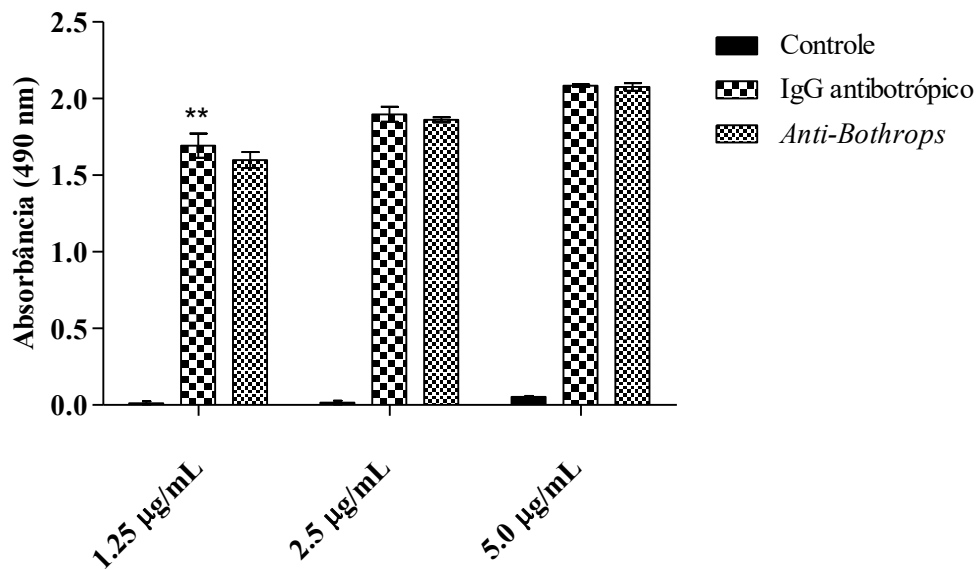


**Figura 9 - ELISA indireto, ligação dos anticorpos anti-*C.d. terrificus* e IgG anticrotática ao pool de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.** Uma microplaca foi revestida com 0,5 µg/mL de pool de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e ensaiada com concentrações crescentes (0,62; 1,25 e 2,5 µg/mL) de anti-*C.d. terrificus* e IgG anticrotática. A capacidade de ligação de anti-*C.d. terrificus* é significativamente diferente da capacidade de ligação de IgG anticrotática ao pool de venenos do gênero *Bothrops* (\*\*p < 0.001). Os pontos representam a média ± desvio padrão da absorbância em 490 nm.



Diante do resultado alcançado por meio da imunopurificação das IgG's anticrotáticas, o mesmo procedimento foi conduzido com as IgG's antibotrópicas, porém com inversão da sequência das colunas. Outro ensaio de ELISA indireto foi realizado, na qual a fase sólida continha 1 µg/mL de pool de venenos do gênero *Bothrops* ou 1 µg/mL de veneno de *C.d. terrificus*. O teste (Figura 10) foi conduzido utilizando-se 1,25; 2,5 e 5,0 µg/mL de anti-*Bothrops*, ou IgG antibotrópica ou IgG de plasma de cavalo não imune.

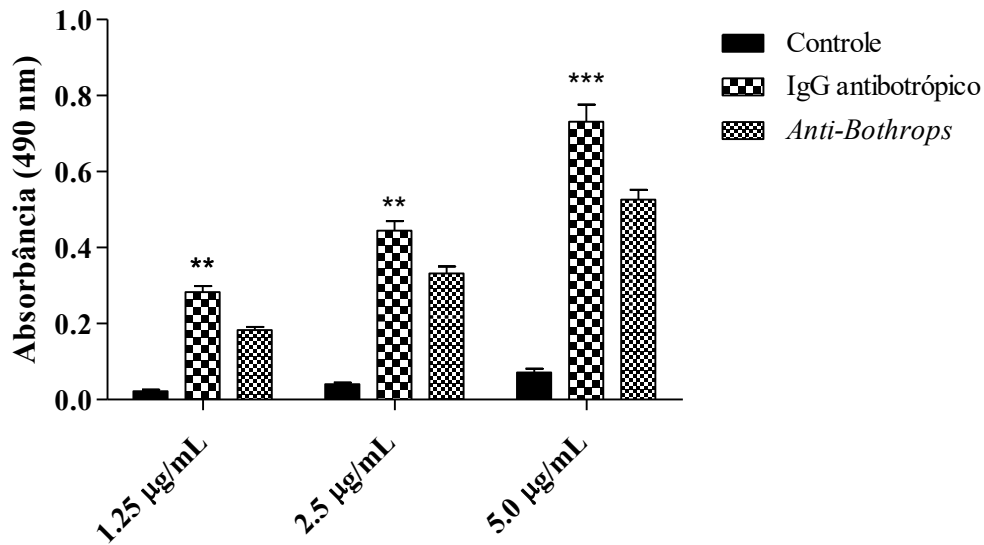
**Figura 10 - ELISA indireto, ligação de anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica com pool de veneno do gênero *Bothrops*.** A microplaca foi sensibilizada com 1 µg/mL de pool de veneno do gênero *Bothrops* e ensaiada nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5 µg/mL de anti-*Bothrops*, IgG antibotrópica e IgG de cavalo não imune. A capacidade de ligação de anti-*Bothrops* é diferente da capacidade de ligação de IgG antibotrópica na concentração de 1,25 µg/mL (\*\*p < 0.01). Os pontos representam a média ± desvio padrão da absorbância em 490 nm.



Nas concentrações 2,5 e 5,0 µg/mL de anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica observar-se sobreposição das absorbâncias, indicando que ambos os anticorpos nesta condição possuem capacidade similar de reconhecimento de pool de veneno de *Bothrops*. Porém, na concentração de 1,25 µg/mL há uma redução da ligação do anti-*Bothrops* em relação à IgG antibotrópica (p<0,01) (Figura 10). Apesar dessa redução, não houve prejuízo no reconhecimento dos venenos de *Bothrops spp*, pois a absorbância resultante estava acima de 1,5.

Ao investigar a reatividade cruzada entre anti-*Bothrops* e veneno de *C.d. terrificus*, observa-se que ambos os anticorpos foram capazes de reconhecer veneno de *C.d terrificus*, porém com reatividades estatisticamente diferentes. Ao utilizar concentração de 5 µg/mL de ambos os anticorpos, houve redução na absorbância de  $0,731 \pm 0,088$  (média ± desvio padrão) usando IgG antibotrópica para  $0,526 \pm 0,053$  usando anti- *Bothrops*, representando uma redução de aproximadamente 40% na reatividade cruzada. A mesma tendência foi observada quando se utilizou 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL de IgG antibotrópica e anti- *Bothrops*, na qual se identificou diminuição da absorbância de  $0,444 \pm 0,051$  para  $0,332 \pm 0,036$  e  $0,283 \pm 0,031$  para  $0,183 \pm 0,016$ , respectivamente (Figura 11). Nas três concentrações avaliadas demonstrou-se que o reconhecimento de ambas as amostras de anticorpos, diante do veneno de *C.d. terrificus*, são diferentes entre si (\*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001).

**Figura 11 - ELISA indireto, ligação de anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica com veneno de *C.d. terrificus*.** A microplaca foi sensibilizada com 1 µg/mL de veneno de *C.d. terrificus* e ensaiada na concentração de (1,25;2,5 e 5 µg/mL) de anti-*Bothrops*, IgG antibotrópica e IgG de cavalo não imune. A capacidade de ligação de anti-*Bothrops* é diferente da capacidade de ligação de IgG antibotrópica ao veneno de *C.d. terrificus* e (\*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001). Os pontos representam a média ± desvio padrão da absorbância em 490 nm.



Com relação à IgG de plasma de cavalo não imune, não há desenvolvimento de resposta em nenhuma das concentrações avaliadas, tanto para venenos de *Bothrops spp* quanto de *C.d. terrificus*.

Portanto, as imunopurificações dos plasmas anticrotáticos e antibotrópicos não comprometeram a eficiência de reconhecimento dos anticorpos, anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops*, aos venenos usados como antígenos, e os tornaram mais específicos por reduzir a reatividade cruzada entre antígenos do veneno de *C.d. terrificus* e de espécies de *Bothrops* e vice-versa.

Uma vez demonstrada a capacidade de anti- *C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* reconhecerem de maneira mais específica os respectivos venenos, tais anticorpos tem potencial para serem utilizados como ferramentas biotecnológicas tanto para mapear epitopos específicos bem como, serem utilizados no desenvolvimento de método de diagnóstico “*in vitro*” dos venenos de *C.d. terrificus* e do gênero *Bothrops*.

### 5.3 Mapeamento, por Spot synthesis, de epitopos lineares das principais toxinas do veneno de *C.d. terrificus* e *B. jararaca*

#### 5.3.1 Membrana de spot contendo peptídeos de toxinas do veneno de *C.d. terrificus*

Para mapear epitopos lineares de células B, a técnica de Spot foi utilizada, por meio de síntese de sequências lineares de 15 resíduos sobrepostos em janela de três, ligados à membrana de celulose, correspondentes às sequências de aminoácidos de algumas proteínas presentes no veneno de *C.d. terrificus*. No mapeamento, os peptídeos covalentemente ligados à membrana de celulose foram ensaiados com: 1. Controle negativo (IgG de plasma de cavalo não imune), 2. Anti-*C.d. terrificus* (IgG anticrotálica imunopurificada), 3. Plasma anticrotálico de cavalo.

##### 5.3.1.1 Crotamina

Um dos principais componentes tóxicos do veneno de cascavel brasileira é um pequeno polipeptídeo básico não enzimático de 42 resíduos, de massa molecular 4,8 kDa da posição 23-64 e ponto isoelétrico igual a 10,3; do qual provoca paralisia dos membros posteriores e necrose do músculo (117) (118).

O mapeamento dos epitopos da crotamina código Uniprot Q9PWF3 com anti-*C.d. terrificus* e plasma anticrotálico, resultou num padrão de ligação semelhante para o conjunto de 18 peptídeos sintéticos sobrepostos em janela de 3, porém de intensidades distintas sendo maior para o anticorpo imunopurificado (Tabela 3).

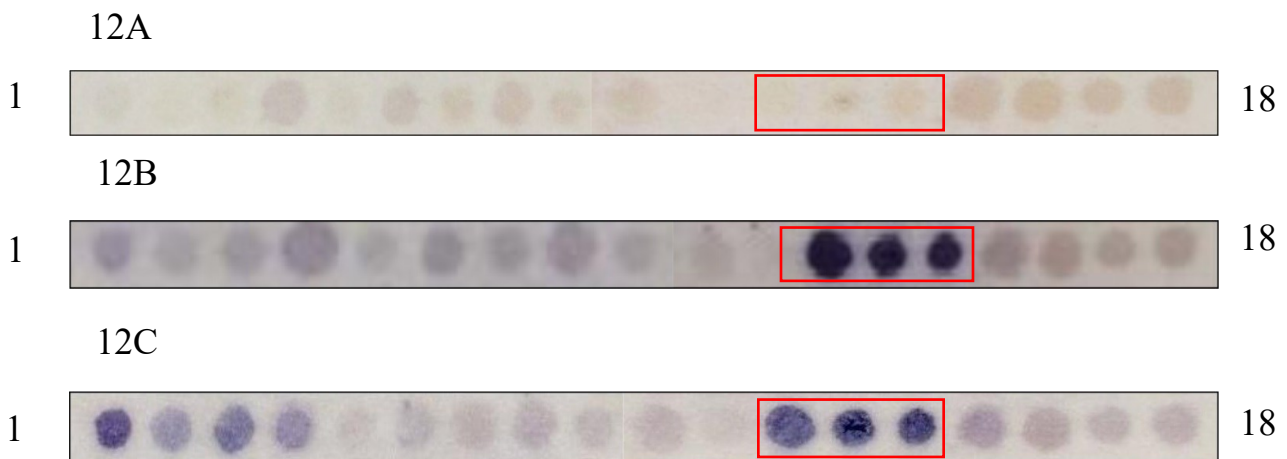
A principal região antigênica contínua identificada está distante do N- e C- terminal, englobando os peptídeos F<sup>34</sup>PKEKICLPPSSDFG<sup>48</sup>; E<sup>37</sup>KICLPPSSDFGKMD<sup>51</sup>; C<sup>40</sup>LPPSSDFGKMDCRW<sup>54</sup>, respectivamente spots 12, 13 e 14 da Tabela 3. A sequência de consenso entre os peptídeos é LPPSSDFGK. A ausência de LPP no lado n-terminal e FGK no lado c-terminal sugere perda de intensidade na ligação ao anti-*C.d. terrificus*, como mostrado na Tabela 3, pelos spots 12 ao 14.

Os resíduos que compõem o spot anterior (12) e posterior (14) àquele com a maior contagem de pixels foram selecionados para compor o peptídeo denominado Crotam1, sintetizado na forma solúvel com 21 resíduos.

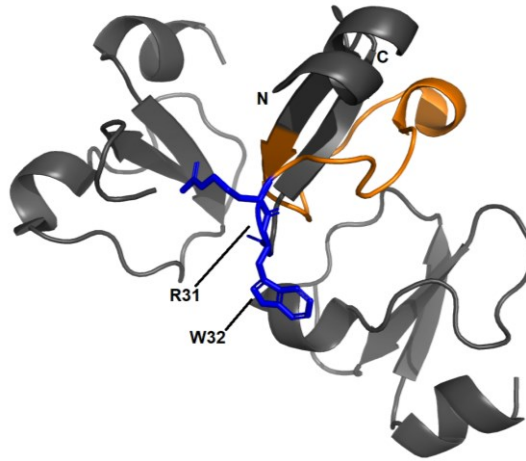
**Tabela 3 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondente à sequência de aminoácidos de crotamina (código Uniprot Q3PWF3).** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*C.d. terrificus* ou plasma anticrotático.

Código Q9PWF3	Sequência MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKQCHKKGGHCF <sup>34</sup> PKEKICLPPSSDFGK MDCR <sup>53</sup> W <sup>54</sup> RWKCCCKGSGK		
A	B	C	D
SPOT	Sequência	Anti- <i>C.d. terrificus</i>	Plasma anticrotático
1	MKILYLLFAFLFLAF	26.344	87.309
2	LYLLFAFLFLAFLSE	18.642	47.946
3	LFAFLFLAFLSEPGN	22.993	65.074
4	FLFLAFLSEPGNAYK	38.940	49.803
5	LAFLSEPGNAYKQCH	13.536	16.599
6	LSEPGNAYKQCHKKG	27.483	22.960
7	PGNAYKQCHKKGGHC	23.404	26.863
8	AYKQCHKKGGHCFPK	30.026	29.430
9	QCHKKGGHCFPKEKI	15.477	23.041
10	KKGGHCFPKEKICLP	16.371	28.479
11	GHCFPKEKICLPPSS	9.934	11.688
12	FPKEKICLPPSSDFG	129.450	85.108
13	EKICLPPSSDFGKMD	105.656	99.996
14	CLPPSSDFGKMDCRW	92.040	89.757
15	PSSDFGKMDCRWRWK	37.079	46.513
16	DFGKMDCRWRWKCKK	29.748	39.600
17	KMDCRWRWKCKKGS	21.444	29.647
18	DCRWRWKCKKGGSGK	29.536	32.992

**Figura 12 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de crotamina (código Uniprot Q3PWF3).** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle - IgG de cavalo não imune na concentração de 35 µg/mL (12A), 2- anti-*C.d. terrificus* na concentração de 35 µg/mL (12B), 3 –Plasma anticrotático de cavalo diluído 1:1000 (12C). A ligação dos anticorpos anticrotáticos foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1: 3000.



**Figura 13 - Modelo 3D de crotamina baseada na estrutura cristalina código PDB - 4GV5.** A estrutura tridimensional da crotamina (código PDB 4GV5) é representada em fitas. Em laranja, a localização do epitopo linear Crotam1 e em azul os resíduos Arg 31 e Trp 32.



A localização do epitopo na estrutura tridimensional código PDB 4GV5 (119) usando o PyMOL Molecular Graphics System (120) é representado em laranja na Figura 12. A análise “in silico” mostrou que os resíduos 34–54 estão expostos na superfície do modelo tridimensional dessa toxina (Figura 12), consistente com o reconhecimento antigênico pelos anticorpos anticrotálicos. Nesta disposição espacial, identificados em cor azul na Figura 13, encontram-se os resíduos Arg 31 e Trp 32, (correspondente às posições 53 e 54 da sequência código PDB Q9PWF3, devido ao peptídeo sinal) potencialmente envolvidos na interação com canais de potássio voltagem dependentes (Kv) (121).

O alinhamento da crotamina com proteína tipo beta-defensina de *B. jaracussu* apresentou identidade de aproximadamente 62% e e-value igual  $2e^{-11}$ , contudo o epitopo linear da crotamina, representado pelos resíduos 34 a 54 que compreende os spots 12 a 14, não possui elevada semelhança com a toxina de *B. jaracussu* (Figura 14), indicando que esta sequência pode ser específica para veneno de *C. d. terrificus*.





### 5.3.1.2 Fosfolipase A2 Crotoxina subunidade básica CBc

Crotoxina (Ctx), é a principal toxina do veneno de serpente de cascavel sul-americana (*C.d. terrificus*), foi a primeira proteína do veneno de serpente a ser purificada e cristalizada (103). A crotoxina é uma  $\beta$ -neurotoxina heterodimérica que consiste em uma fosfolipase básica fracamente tóxica A2, componente B (crotoxina B, CB ou *C.d. terrificus* PLA2) e um componente ácido não-enzimático não tóxico A (CA, crotapotina) (122).

Para rastrear quais sequências de aminoácidos da crotoxina B são epitopos lineares de células B reconhecidos por anti-*C.d. terrificus*, uma membrana contendo peptídeos sobrepostos de 15 mer derivados da sequência de aminoácidos de PLA2 foi sintetizada. A Fosfolipase A2 crotoxina básica subunidade Cbc (código Uniprot P62022) é composta por peptídeo sinal (resíduos 1-16) e cadeia (17-138). Três sequências peptídicas, correspondentes aos spots 5, 16 e 42, mostraram interação tanto com o anti-*C.d. terrificus* quanto com plasma anticrotálico, sendo que a sequência relativa ao spot 42 foi a mais reativa com anti-*C.d. terrificus* (Tabela 4). Além disso, dentre todas as toxinas avaliadas por este método, Crotoxina B apresentou a maior capacidade de ligação, na qual o c-terminal, MFYPDSRCRGPSETC, resultou na maior contagem de pixels pelo software Image J.

A sequência correspondente ao spot 5 contém a His17 que forma complexos mais estáveis, altamente tóxicos com a subunidade CA (123). Apesar de não ser neurotóxica, é responsável no complexo CA-CB por aumentar a potência letal do CB não complexado, por reduzir a tendência de ligações inespecíficas do componente B.

Então, resíduos dos spots 4 ( $L^{10}LVGVEGHLLQFNKM^{24}$ ) e 6 ( $G^{16}HLLQFNKMIKFETR^{30}$ ) foram utilizados juntamente com a sequência do spot 5 ( $G^{13}VEGHLLQFNKMIKF^{27}$ ) para compor o segundo peptídeo a ser sintetizado de 21 resíduos, denominado Ctx2 que está localizado na região n-terminal (Figura 15B).

No meio da estrutura primária da Crotoxina B, localizou-se a segunda região de alta reatividade com o anti-*C.d. terrificus*, composta pelos spots 15 ( $Y^{43}CGWGGRGRPKDATD^{57}$ ), 16 ( $W^{46}GGRGRPKDATDRCC^{60}$ ) e 17 ( $R^{49}GRPKDATDRCCFVH^{63}$ ), que foram selecionados para compor o peptídeo nomeado Ctx3 (Figura 15B). Esta região possui a Tyr 43, Gly 45 e Gly 47, resíduos estruturalmente relacionados com a coordenação do íon  $Ca^{2+}$ , cofactor da PLA2 (28).

A porção c-terminal, região mais intensamente reconhecida pelo anti-*C.d. terrificus*, irá compor o epitopo denominado Ctx4, que compreende as sequências dos spots 40

(T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCR<sup>132</sup>), 41 (Y<sup>121</sup>GYMFYPDSRCRGPS<sup>135</sup>) e 42 (M<sup>124</sup>FYPDSRCRGPSETC<sup>138</sup>) (Figura 15B). Este peptídeo contém a Gly 133, responsável pela mais alta atividade anticoagulante comparada ao Cba2 (124). A região C-terminal é anfifílica, contém vários resíduos carregados positivamente e é reconhecida por ser crítica para a toxicidade por meio da ruptura não-enzimática da membrana plasmática das fibras musculares esqueléticas (125).

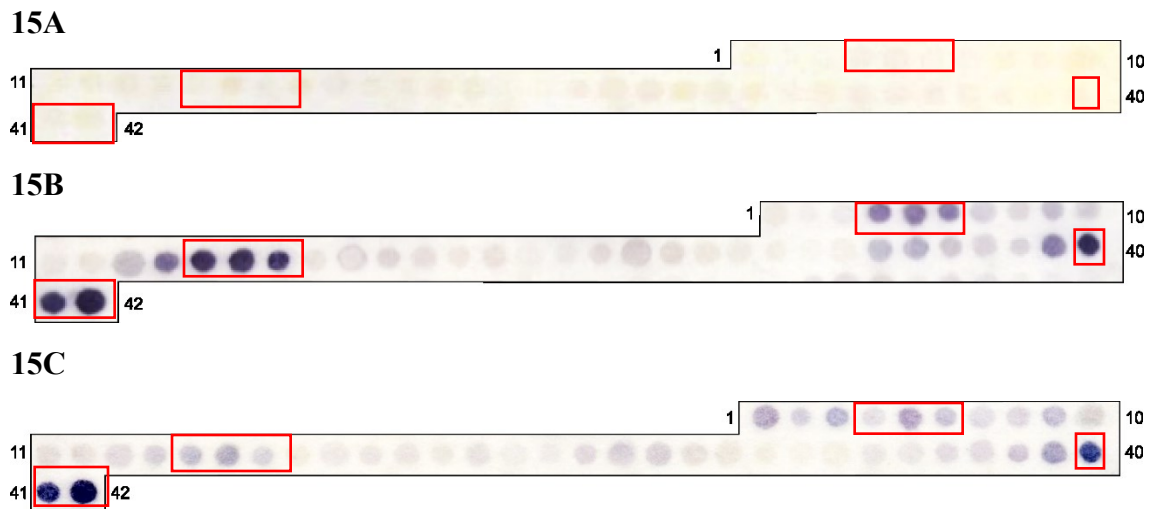
Tal como observado no mapeamento da crotamina (código Uniprot Q9PWF3), constatou-se que a intensidade dos spots reativos da crotoxina B (código Uniprot P62022) foi maior com o anti- *C.d. terrificus* do que com o plasma anticrotálico. Isso pode ser devido ao processo de precipitação e purificação que remove outras proteínas que não interagem com o antígeno.

**Tabela 4 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondente à sequência de aminoácidos de PLA2 (código Uniprot P62022).** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*C.d. terrificus* ou plasma anticrotático.

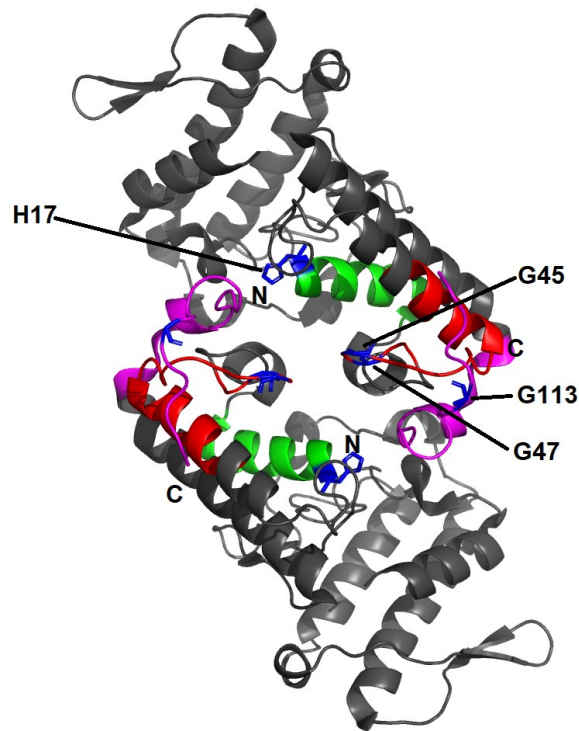
Entry P62022	Sequence MRALWIVA VL <sup>10</sup> LVGVEGHLLQFNKMIKFETR <sup>30</sup> KNAIPFYAFYGCY <sup>43</sup> CGWGGRRPKDATDRCCFVH <sup>63</sup> DCCYGKLAKCNTKWDIYPYSL KSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAECLRRSLST <sup>118</sup> YKYGYMFYP DSRCRGPSETC <sup>138</sup>		
A	B	C	D
SPOT	Sequence	Anti- <i>C.d. terrificus</i>	Plasma anticrotático
1	MRALWIVAVLLVGVE	14.079	67.619
2	LWIVAVLLVGVEGHL	8.384	38.090
3	VAVLLVGVEGHLLQF	13.291	58.629
4	LLVGVEGHLLQFNKM	<b>58.351</b>	<b>31.847</b>
5	GVEGHLLQFNKMIKF	<b>59.205</b>	<b>66.769</b>
6	<b>GHLLQFNKMIKFETR</b>	<b>54.411</b>	<b>48.620</b>
7	LQFNKMIKFETRKNA	28.682	34.687
8	NKMIKFETRKNAIPF	22.874	37.645
9	IKFETRKNAIPFYAF	33.258	52.584
10	ETRKNAIPFYAFYGC	27.649	44.070
11	KNAIPFYAFYGCYCG	9.993	27.781
12	IPFYAFYGCYCGWGG	14.079	29.765
13	YAFYGCYCGWGGRRGR	44.510	36.009
14	YGCYCGWGGRRPKD	71.550	39.295
15	<b>YCGWGGRRPKDATD</b>	<b>100.404</b>	<b>48.712</b>
16	<b>WGGRRPKDATDRCC</b>	<b>106.868</b>	<b>63.637</b>
17	<b>RGRPKDATDRCCFVH</b>	<b>83.344</b>	<b>35.214</b>
18	PKDATDRCCFVHDCC	17.000	21.092
19	ATDRCCFVHDCCYGK	24.272	23.490
20	RCCFVHDCCYGKLAK	22.755	24.019
21	FVHDCCYGKLAKCNT	19.179	25.369
22	DCCYGKLAKCNTKWD	11.861	23.201
23	YGKLAKCNTKWDIYP	16.477	29.633
24	LAKCNTKWDIYPYSL	8.126	17.487
25	CNTKWDIYPYSLKSG	10.788	17.230
26	KWDIYPYSLKSGYIT	18.927	33.449
27	IYPYSLKSGYITCGK	33.106	41.623
28	YSLKSGYITCGKGTW	21.483	43.826
29	KSGYITCGKGTWCEE	15.887	33.405
30	YITCGKGTWCEEQIC	14.563	27.190
31	CGKGTWCEEQICECD	10.060	17.749
32	GTWCEEQICECDRVA	6.325	13.595
33	CEEQICECDRVAECLRR	9.556	19.985
34	QICECDRVAECLRR	37.616	24.774
35	ECDRVAECLRRSL	43.364	23.560
36	RVAECLRRSLSTYK	30.046	33.714
37	AECLRRSLSTYKGY	26.033	34.870
38	LRRSLSTYKGYMFY	21.404	42.798

39	SLSTYKYGYMFYPDS	66.834	68.777
40	TYKYGYMFYPDSRCR	89.291	105.216
41	YGYMFYPDSRCRGPS	96.132	114.525
42	MFYPDSRCRGPSETC	128.291	150.015

**Figura 15 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de PLA2.** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle – IgG de cavalo não imune na concentração de 35 µg/mL (15A), 2- anti-*C.d. terrificus* na concentração de 35 µg/mL (15B), 3 –Plasma anticrotálico de cavalo diluído 1:1000 (15C). A ligação dos anticorpos anticrotálicos foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:3000.



**Figura 16 - Modelo 3D de PLA2 código Uniprot P62022 baseado na estrutura cristalina código PDB 2QOG.** Localização dos peptídeos selecionados que reagiram com anti-*C.d. terrificus* no modelo tridimensional de crotoxina B, PLA2 básica CB2, em cinza. Em verde, a sequência LLVGVEGH<sup>17</sup>LLQFNKMIKFETR com histidina 17 em azul, nomeada Ctx2. Em vermelho, a sequência Y<sup>43</sup>CG<sup>45</sup>WG<sup>47</sup>GRGRPKDATDRCCFVH nomeada Ctx3 com tirosina 43, glicina 45 e 47 em azul, e em magenta a sequência TYKYGYMFYPDSRCRG<sup>133</sup>PSETC com glicina em azul.



Os epítopos da crotoxina B que foram mapeados utilizando o anti-*C.d. terrificus*, estão de acordo com os descritos anteriormente em estudos de cristalografia, no qual os locais mais prováveis relacionados à atividade neurotóxica (regiões n e c-terminais, alças de ligação ao Ca<sup>2+</sup> e folhas β) estão expostos na superfície do tetrâmero e seus dímeros isoladamente (28). Portanto, essas regiões podem estar envolvidas na capacidade de anticorpos anticrotálicos em neutralizar os efeitos neurotóxicos.

A análise “*in silico*” da localização dos peptídeos Ctx2, Ctx3 e Ctx 4 baseou-se na estrutura cristalográfica código PDB 2QG3, usando o PyMOL Molecular Graphics System (120) está representado na figura 16.

Ao analisar as sequências de PLA2 de *C.d. terrificus* e *B. moojeni*, o alinhamento resultou numa identidade de aproximadamente 67% e e-value de <sup>2e-66</sup>. A sequência que representa o peptídeo Ctx3 (resíduos 43 a 63) apresenta grande semelhança com a PLA2 de *B. moojeni* (Figura 17). Não obstante, percebe-se que a reatividade dos spots que contém a sequência do referido epítopo foram mais intensas ao se utilizar o anti-*C.d. terrificus* do que o

plasma anticrotálico, o mesmo foi observado para o spots que representa Ctx2 (resíduos 10 a 30).

**Figura 17 - Alinhamento realizado na plataforma Blast entre Crotoxina B Código Uniprot P62022 de *C.d. terrificus* e PLA2 de *B. moojeni* Código Uniprot ATU8528, representado no programa Jalview versão 2.11.0.**

Query: sp|P62022|PA2BC\_CRODU Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=*C.d. terrificus* OX=8732 PE=1 SV=1 Query ID: lcl|Query\_56261 Comprimento: 138

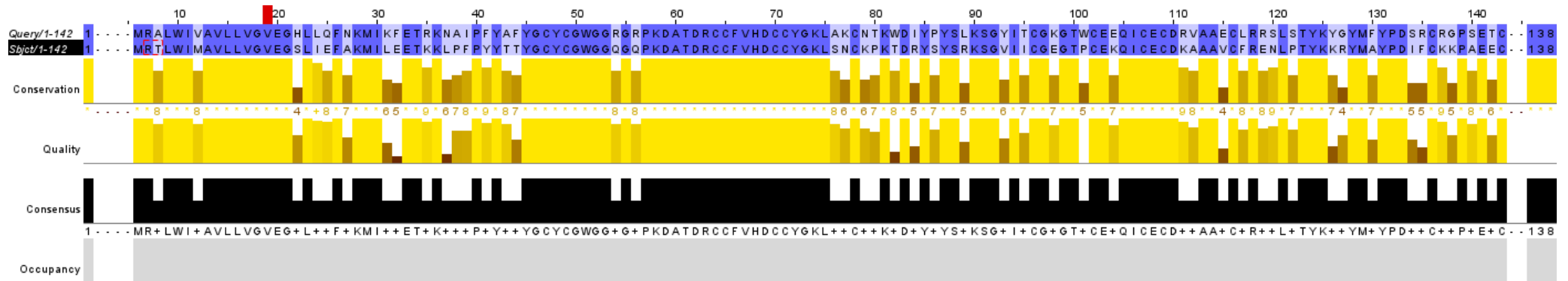
>basic phospholipase A2 myotoxin, partial [*Bothrops moojeni*]

Sequência ID: ATU85528.1 Comprimento: 138

Intervalo 1: 1 a 138

Score: 192 bits (489), Expect: 2e-66,

Identicidades: 92/138(67%), Positivos: 106/138(76%), Gaps: 0/138(0%)





### 5.3.1.3 Giroxina

A giroxina é uma glicoproteína de 33 kDa com 3,8% de seu peso composto pela unidade de açúcar e, uma das principais serino proteases do veneno de *C.d. terrificus*, representando cerca de 2% do teor de proteína no veneno bruto (35).

Os membros da família de serino proteases são caracterizados por um mecanismo catalítico comum que inclui um resíduo de serina altamente reativo, que desempenha um papel fundamental na formação de um complexo de acilenzima transitória, estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico no sítio ativo (126). As identidades da sequência de aminoácidos e estrutura 3D dessas enzimas são semelhantes, dobradas em um barril formado por fitas  $\beta$  conectadas por segmentos trans e duas  $\alpha$  hélices curtas (127).

Os resultados do ensaio da membrana contendo a sequência de aminoácidos de giroxina código Uniprot Q58G94 estão resumidos na Tabela 5. As reatividades foram distintas entre os anticorpos utilizados (Figura. 18B e 18C) sendo muito mais intensa ao usar plasma anticrotático.

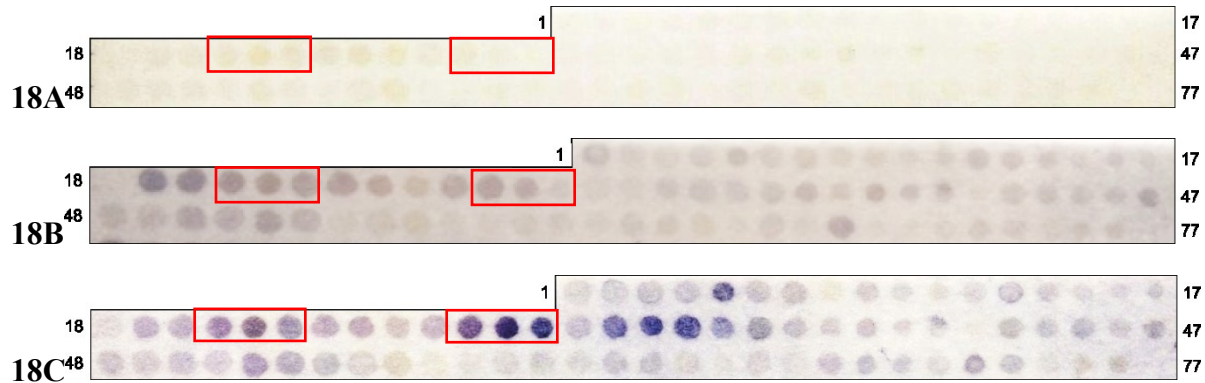
Duas sequências destacaram-se KEQRRFPKEKYFFNC (spot 22) e WDKDIMLIRLNKPVS (spot 29). A sequência identificada como consenso, considerando-se os peptídeos 21,22 e 23, contém os resíduos RRFPEKYF. Para os peptídeos 28,29 e 30 foi D<sup>88</sup>IMLIRLNK, que contém o Asp 88 que está diretamente envolvido na catálise das serino proteases, e, portanto, uma região conservada desta classe de proteína.

**Tabela 5 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondente à sequência de aminoácidos de Giroxina (código Uniprot Q58G94).** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*C.d. terrificus* ou plasma anticrotático.

Código Q58G94	VIGGDECNINERNNFLVALYEYWSQSFLCGGTLINGEWVLTAAHCDRKHILIIYVG VHDERSVQ <sup>61</sup> FDKEQRRFPKEYFFNCRNN <sup>81</sup> F <sup>82</sup> TKWDKDIMLIRLNKPVSYSE <sup>102</sup> HIAPLSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYGV CRTAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTCHRDSGGPLICNGEFQGI VSWGDC SCAQPDKPALYSKVFHDHLDWIQNIAGSETVNCPS		
A	B	C	D
SPOT	Sequência	Anti- <i>C.d. terrificus</i>	Plasma anticrotático
1	VIGGDECNINERNNFL	17.583	20.070
2	GDECNINERNNFLVAL	10.153	21.585
3	CNINERNNFLVALYEY	8.569	25.169
4	NERNNFLVALYEYWSQ	8.796	24.455
5	NFLVALYEYWSQSFL	11.051	53.438
6	VALYEYWSQSFLCGG	8.856	26.531
7	YEYWSQSFLCGGTLI	9.958	30.016
8	WSQSFLCGGTLINGE	8.565	14.834
9	SFLCGGTLINGEWVL	9.102	28.781
10	CGGTLINGEWVLTAA	7.583	22.688
11	TLINGEWVLTAAHCD	9.741	18.766
12	NGEWVLTAAHCDRKH	11.606	20.473
13	WVLTAAHCDRKHILI	9.083	30.436
14	TAAHCDRKHILIIYVG	9.125	23.907
15	HCDRKHILIIYVG VHD	6.231	15.495
16	RKHILIIYVG VHDERSV	7.519	14.585
17	ILIIYVG VHDERSVQFD	7.157	17.920
18	YVG VHDERSVQFDKEQ	3.347	14.709
19	VHDERSVQFDKEQRRF	31.708	36.406
20	RSVQFDKEQRRFPKE	32.560	37.229
<b>21</b>	<b>QFDKEQRRFPKEYF</b>	<b>25.870</b>	<b>50.771</b>
<b>22</b>	<b>KEQRRFPKEYYFFNC</b>	<b>22.597</b>	<b>60.642</b>
<b>23</b>	<b>RRFPKEYYFFNCRNN</b>	<b>21.204</b>	<b>49.523</b>
24	PKEYYFFNCRNNFTK	22.231	39.730
25	KYFFNCRNNFTKWDK	16.375	42.467
26	FNCRNNFTKWDKDIM	11.190	31.306
27	RNNFTKWDKDIMLIR	20.583	39.023
<b>28</b>	<b>FTKWDKDIMLIRLNK</b>	<b>24.731</b>	<b>63.612</b>
<b>29</b>	<b>WDKDIMLIRLNKPV</b>	<b>17.681</b>	<b>78.665</b>
<b>30</b>	<b>DIMLIRLNKPVSYSE</b>	<b>7.292</b>	<b>67.793</b>
31	LIRLNKPVSYSEHIA	6.384	27.158
32	LNKPVSYSEHIAPLS	6.250	51.892
33	PVSYSSEHIAPLSLPS	9.218	59.249
34	YSEHIAPLSLPSSPP	10.931	60.770
35	HIAPLSLPSSPPIVG	8.694	40.904
36	PLSLPSSPPIVGSVC	9.958	42.838
37	LPSSPPIVGSVCRVM	11.148	28.922
38	SPPIVGSVCRVMGWG	7.481	22.698
39	IVGSVCRVMGWGTIK	11.847	30.274

40	SVCRVMGWGTIKSPQ	8.083	20.701
41	RVMGWGTIKSPQETL	10.088	26.089
42	GWGTIKSPQETLPDV	4.824	10.920
43	TIKSPQETLPDVPHC	8.981	30.844
44	SPQETLPDVPHCANI	9.014	25.461
45	ETLPDVPHCANINLL	8.917	28.039
46	PDVPHCANINLLDYG	9.384	18.505
47	PHCANINLLDYGVCR	13.181	28.565
48	ANINLLDYGVCRTAH	10.069	26.766
49	NLLDYGVCRTAHPQF	12.097	24.001
50	DYGVCRTAHPQFRLP	19.597	28.185
51	VCRTAHPQFRLPATS	15.815	25.324
52	TAHPQFRLPATSRI	20.417	43.745
53	PQFRLPATSRI	14.157	38.757
54	RLPATSRI	4.981	33.392
55	ATSRILCAGVLEGGI	9.079	24.219
56	RILCAGVLEGGIDTC	9.352	27.691
57	CAGVLEGGIDTCHRD	6.759	13.047
58	VLEGGIDTCHRDSGG	5.838	13.031
59	GGIDTCHRDSGGPLI	7.796	18.000
60	DTCHRDSGGPLICNG	6.699	19.503
61	HRDSGGPLICNGEFQ	5.093	17.105
62	SGGPLICNGEFQGIV	8.704	24.189
63	PLICNGEFQIVSWG	7.713	24.008
64	CNGEFQIVSWG	7.153	14.508
65	EFQIVSWG	3.431	11.061
66	GIVSWG	9.370	19.362
67	SWG	5.528	14.000
68	DGSCAQPDKPALYSK	17.676	24.676
69	CAQPDKPALYSKVFD	4.088	28.672
70	PDKPALYSKVFDHLD	4.269	20.870
71	PALYSKVFDHLDWIQ	5.449	16.935
72	YSKVFDHLDWIQNII	8.435	39.287
73	VFDHLDWIQNIIAGS	8.616	27.927
74	HLDWIQNIIAGSETV	7.940	12.902
75	WIQNIIAGSETVNCP	8.880	18.572
76	IQNIIAGSETVNCPS	8.491	21.305

**Figura 18 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de giroxina.** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle - IgG de cavalo não imune na concentração de 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (18A), 2- anti-*C.d. terrificus* na concentração de 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (18B), 3- Plasma anticrotático de cavalo diluído 1:1000 (18C). A ligação dos anticorpos anticrotáticos foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:3000.



Uma vez que houve diferença tão acentuada de resposta entre plasma anticrotático e anti-*C.d. terrificus*, realizou-se o alinhamento da giroxina código Uniprot Q58G94 de *C.d. terrificus* com a serino protease de *B. jararaca* código Uniprot Q9PTU8.

O alinhamento entre as sequências das duas proteínas revelou identidade de 69% e  $e\text{-value } 3e^{-120}$ , e a sequência relativa à D<sup>88</sup>IMLIRLNK da giroxina é praticamente idêntica à da serino protease de *B. jararaca* (D<sup>88</sup>IMLIRLNR), havendo apenas a substituição da lisina (K) um aminoácido básico, por outro de mesmo caráter, a arginina (R) (Figura 19).

Deste modo, infere-se que a redução do reconhecimento das sequências formadas pelos spots 21 a 23 (resíduos 61 a 81) e 28 a 30 (resíduos 82 a 102) pelo anti-*C.d. terrificus* pode ser devido à etapa de purificação contra pool de veneno do gênero *Bothrops*, que foi capaz de remover anticorpos que se ligam a regiões conservadas de ambas as serinoproteases.

**Figura 19 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da gioxina Código Uniprot Q58G94 de *C.d. terrificus* e serino protease de *B. jararaca* Código Uniprot Q9PTU, representado no programa Jalview versão 2.11.0.**

Query: sp|Q58G94|VSP21\_CRODU Thrombin-like enzyme gyroxin B2.1 OS=*C.d. terrificus* OX=8732 PE=2 SV=1 Query ID: lcl|Query\_16658

Comprimento: 238

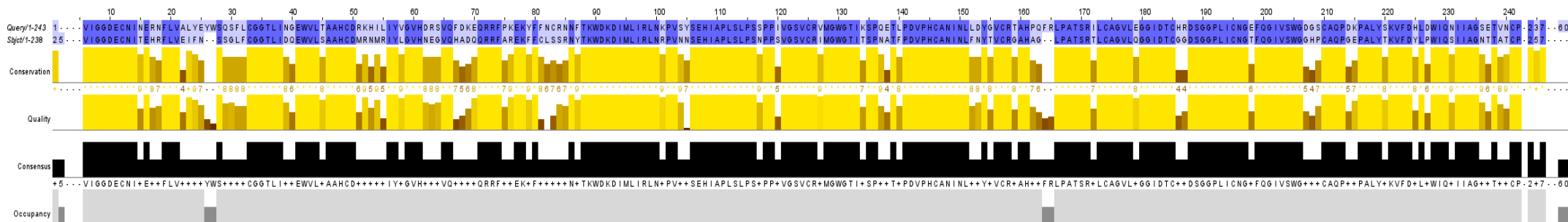
>RecName: Full=Snake venom serine protease BPA; Short=SVSP; AltName: Full=Bothrops protease A; Short=BPA; Flags: Precursor [*Bothrops jararaca*]

Sequência ID: Q9PTU8.1 Comprimento: 258

Intervalo 1: 25 a 257

Score: 338 bits (866), Expect:3e-120,

Identicidades: 163/237(69%), Positivos: 187/237(78%), Gaps: 4/237(1%)



#### 5.3.1.4 Fator de crescimento neural de veneno vNGF (Venom nerve growth factor)

A proteína designada fator de crescimento neural de veneno (vNGF) tem sido purificada de fontes como a glândula submaxilar de camundongos machos adultos (128) e veneno de serpente (129). É caracterizada como uma família de proteínas responsáveis pela diferenciação e manutenção de neurônios sensoriais simpáticos e embrionários do sistema nervoso periférico de vertebrados (130). Por estar associado a muitos efeitos não neuronais de influência sistêmica, sugere-se que o vNGF induz uma elevação do acesso de componentes tóxicos ao local de ação (38)(39).

A partir da sequência de aminoácidos de vNGF, código Uniprot Q9DEZ9A, sintetizou-se 77 peptídeos de 15-mer sobrepostos em janela de 3. Os spots 1,2, 3 responderam intensamente com o plasma anticrotálico. A sequência de resíduos dos spots 1 ao 3, M<sup>1</sup>SMLCYTLIIAFLIGIWA<sup>18</sup>APK<sup>21</sup>, contém em si o peptídeo sinal (resíduos 1 a 18), que usualmente é removido na proteína madura. Os peptídeos 52 a 54, representados pela sequência G<sup>154</sup>NLVTVMVDVNINNNVYKQYF<sup>174</sup> também foram intensamente reconhecidos pelos anticorpos presentes no plasma anticrotálico, o que não ocorreu com o anti-*C.d. terrificus* (Tabela 6).

**Tabela 6 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondentes à sequência de aminoácidos de vNGF (código Uniprot Q9Dez9).** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*C.d. terrificus* imunopurificado ou plasma anticrotático.

A	B	C	D
SPOT	Sequência	Anti- <i>C.d. terrificus</i>	Plasma anticrotático
Q9DEZ9	Sequência M <sup>1</sup> SMLCYTLIIAFLIGIWAAPK <sup>21</sup> SEDNVPLGSPATSDLSDTSCAKTHEALKT SRNIDQHYPAPKKAEDQEFGSAANIIVDPKLFQKRRFQSPRVLFSTQPPPLS RDEQSVDNANSLNRNIRAKREDHPVHKRGEYSVCDSNVVWANKTTAT DIRG <sup>154</sup> NLVTVMVDVNINNNVYKQYF <sup>174</sup> FETKCRNPNPVPTGCRGIDARH WNSYCTTTNTFVKALTMEGNQASWRFIRIDSACVCVISRKNENFG		
1	MSMLCYTLIIAFLIG	8.053	59.619
2	LCYTLIIAFLIGIWA	10.113	51.997
3	TLIIAFLIGIWAAPK	28.245	50.999
4	IAFLIGIWAAPKSED	10.874	38.027
5	LIGIWAAPKSEDNVP	7.113	14.347
6	IWAAPKSEDNVPLGS	6.536	10.355
7	APKSEDNVPLGSPAT	6.245	8.197
8	SEDNVPLGSPATSDL	5.841	6.564
9	NVPLGSPATSDLSDT	4.179	7.058
10	LGSPATSDLSDTSCA	9.132	13.861
11	PATSDLSDTSCAKTH	7.550	11.688
12	SDLSDTSCAKTHEAL	6.172	9.749
13	SDTSCAKTHEALKTS	15.384	17.529
14	SCAKTHEALKTSRNI	21.821	22.778
15	KTHEALKTSRNIDQH	9.285	10.737
16	EALKTSRNIDQHYP	6.212	9.521
17	KTSRNIDQHYPAPK	23.444	24.802
18	RNIDQHYPAPKKAED	7.199	8.712
19	DQHYPAPKKAEDQEF	4.821	8.143
20	YPAPKKAEDQEFGSA	1.947	5.179
21	PKKAEDQEFGSAANI	6.245	7.758
22	AEDQEFGSAANIIVD	4.768	9.235
23	QEFGSAANIIVDPKL	13.404	16.020
24	GSAANIIVDPKLFQK	34.967	28.458
25	ANIIVDPKLFQKRRF	26.351	35.793
26	IVDPKLFQKRRFQSP	31.470	28.587
27	PKLFQKRRFQSPRVL	29.079	29.086
28	FQKRRFQSPRVLFST	18.967	17.679
29	RRFQSPRVLFSTQPP	13.444	18.521
30	QSPRVLFSTQPPPLS	13.616	21.598
31	RVLFSSTQPPPLSRDE	3.854	14.062
32	FSTQPPPLSRDEQSV	3.013	11.547
33	QPPPLSRDEQSVDNA	2.517	5.185
34	PLSRDEQSVDNANSL	3.053	6.440
35	RDEQSVDNANSLNRN	15.252	10.882
36	QSVDNANSLNRNIRA	22.662	17.162
37	DNANSLNRNIRAKRE	37.219	27.355

38	NSLNRNIRAKREDHP	19.662	16.926
39	NRNIRAKREDHPVHK	22.987	42.588
40	IRAKREDHPVHKRGE	21.113	56.733
41	KREDHPVHKRGEYSV	9.417	19.256
42	DHPVHKRGEYSVCDS	10.159	34.858
43	VHKRGEYSVCDSVNV	5.675	12.718
44	RGEYSVCDSVNVWVA	7.331	17.932
45	YSVCDSVNVWVANKT	23.391	31.607
46	CDSVNVWVANKTTAT	19.709	24.299
47	VNVWVANKTTATDIR	28.881	22.074
48	WVANKTTATDIRGNL	16.583	17.462
49	NKTTATDIRGNLTV	18.265	32.896
50	TATDIRGNLVTVMVD	8.603	15.587
51	DIRGNLVTVMVDVNI	7.272	37.027
52	GNLVTVMVDVNINNN	10.689	52.886
53	VTVMVDVNINNNVYK	26.099	62.216
54	MVDVNINNNVYKQYF	14.192	45.999
55	VNINNNVYKQYFFET	13.404	39.117
56	NNNVYKQYFFETKCR	23.695	39.467
57	VYKQYFFETKCRNPN	16.603	27.952
58	QYFFETKCRNPNPVP	13.801	23.356
59	FETKCRNPNPVPTGC	14.179	26.421
60	KCRNPNPVPTGCRGI	17.781	26.647
61	NPNPVPTGCRGIDAR	26.285	25.608
62	PVPTGCRGIDARHWN	15.808	24.687
63	TGCRGIDARHWNSYC	21.477	29.618
64	RGIDARHWNSYCTTT	17.828	30.554
65	DARHWNSYCTTTNTF	12.636	28.661
66	HWNSYCTTTNTFVKA	19.894	25.054
67	SYCTTTNTFVKALTM	18.834	24.028
68	TTTNTFVKALTMEGN	3.278	5.932
69	NTFVKALTMEGNQAS	3.152	7.252
70	VKALTMEGNQASWRF	16.172	24.462
71	LTMEGNQASWRFIRI	22.344	41.724
72	EGNQASWRFIRIDSA	6.397	13.975
73	QASWRFIRIDSACVC	12.603	36.198
74	WRFIRIDSACVCVIS	11.993	46.262
75	IRIDSACVCVISRKN	17.775	30.920
76	DSACVCVISRKNENF	13.974	21.178
77	SACVCVISRKNENFG	12.020	19.293



**Figura 20 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de vNGF.** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle - IgG de cavalo não imune na concentração de 35 µg/mL (20A), 2- anti-*C.d. terrificus* na concentração de 35 µg/mL (20B), 3 –Plasma anticrotálico de cavalo diluído 1:1000 (20C). A ligação dos anticorpos anticrotálicos foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:3000.

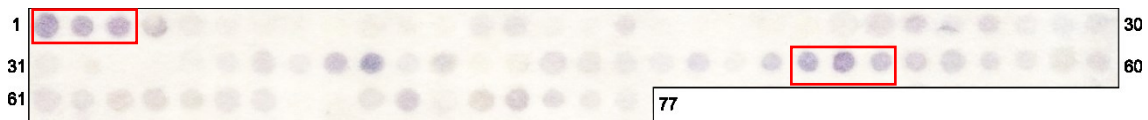
**20A**



**20B**



**20C**



O alinhamento entre vNGF de *C.d. terrificus* código Uniprot Q9DEZ9 e de *B. jaracussu* código Uniprot Q90W38 apresentou identidade de 96% e e-value  $1e^{-179}$  (Figura 21), suportando a hipótese de que a imunopurificação de IgG anticrotálica foi eficaz em reduzir a reatividade cruzada entre os venenos de ambas as espécies.

Portanto, a incapacidade do anti-*C.d. terrificus* de se ligar aos peptídeos citados acima, por serem sequências conservadas e comuns entre as serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, pode ser devido a remoção da reatividade cruzada por causa da imunopurificação contra o veneno do gênero *Bothrops* (Figura 20B e 20C).

**Figura 21 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da vNGF código Uniprot Q9DEZ9 de *C.d. terrificus* e vNGF de *B. jararacussu* código Uniprot Q90W38, representado no programa Jalview versão 2.11.0.**

Query: sp|Q9DEZ9|NGFV\_CRODU Venom nerve growth factor OS=*C.d. terrificus* OX=8732 PE=2 SV=1 Query ID: lc|Query\_58760

Comprimento: 241

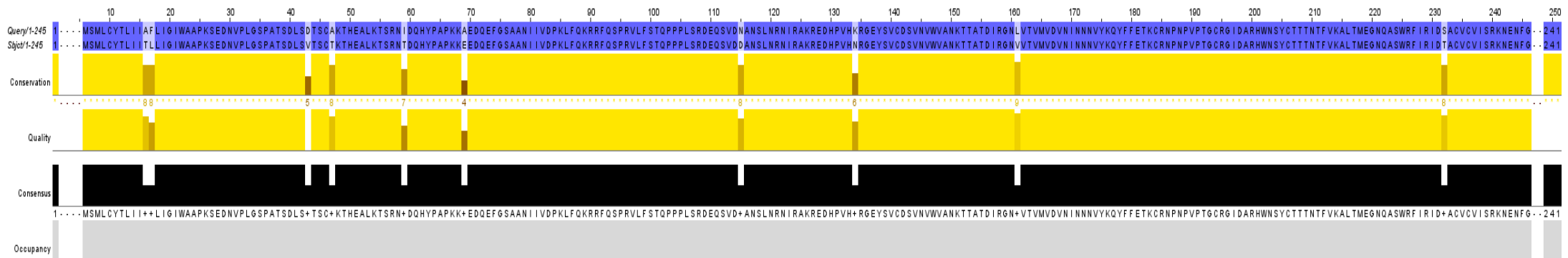
>RecName: Full=Venom nerve growth factor; Short=v-NGF; Short=vNGF; AltName: Full=Bj-NGF; Flags: Precursor [*Bothrops jararacussu*]

Sequência ID: Q90W38.1 Comprimento: 241

Intervalo 1: 1 a 241

Score: 487 bits (1254), Expect:1e-179,

Identicidades: 231/241(96%), Positivos: 234/241(97%), Gaps: 0/241(0%)



Assim sendo, a utilização do anti-*C.d. terrificus* permitiu mapear com reduzida reatividade cruzada contra o veneno de espécies do gênero *Bothrops*, epitopos lineares de células B do veneno de *C.d. terrificus*.

### **5.3.2 Membrana de spot contendo peptídeos de toxinas do veneno de *B. jararaca***

Para mapear possíveis epitopos lineares de célula B de diversas toxinas de *B. jararaca*, uma membrana de celulose foi sintetizada com peptídeos de 15 resíduos, sobrepostos em janela de 3.

As seguintes proteínas: Zinco metaloprotease disintegrina-tipo bothropasina (SVMP) código Uniprot O93523; Serino protease (SVSP) código Uniprot Q9PTU8; Fosfolipase ácida A2 código Uniprot P81243, SNACLEC botrocetina subunidade alfa código Uniprot P22029, SNACLEC botrocetina subunidade beta código Uniprot P22030 e Peptídeo natriurético e potencializador de bradicinina código Uniprot Q6LEM5, foram avaliados com anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica.

Das 6 toxinas avaliadas apenas metaloprotease, SNACLEC botrocetina subunidade beta e PLA2 foram reconhecidas por ambas as amostras contendo anticorpos antibotrópicos. Demais toxinas não foram responsivas as amostras utilizadas, indicando que os epitopos são potencialmente não-lineares.

#### **5.3.2.1 Zinco metaloprotease**

Para cobrir a sequência primária da Bothropasina, composta por peptídeo sinal, resíduos 1 -20, propeptídeo de 21 a 191 e domínio zinco metaloprotease-disintegrina-tipo bothropasina de 192 a 610, foi necessário sintetizar uma membrana com 193 peptídeos. Apenas aqueles que reagiram aos anticorpos (Figura 22B e 22C) foram considerados potenciais epitopos lineares da proteína e foram descritos na tabela 7. Além disso, de modo sistemático, a contagem de pixels foi menor ao se utilizar anti-*Bothrops* em comparação à IgG antibotrópica.

**Tabela 7 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos da sequência de aminoácidos de zinco metaloprotease (código Uniprot O93523) reconhecidos por anticorpos antibotrópicos.** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*Bothrops* ou IgG antibotrópica.

A	Sequência		
	B	C	D
Spot	Sequência	Anti- <i>Bothrops</i>	IgG antibotrópica
657	A-E-Q-Q-K-Y-N-P-F-R-Y-V-E-L-F	65.490	107.096
658	Q-K-Y-N-P-F-R-Y-V-E-L-F-I-V-V	56.115	102.644
659	N-P-F-R-Y-V-E-L-F-I-V-V-D-Q-G	55.510	99.356
668	K-A-R-M-Y-E-L-A-N-I-V-N-E-I-L	60.423	61.692
669	M-Y-E-L-A-N-I-V-N-E-I-L-R-Y-L	55.442	103.260
675	A-A-L-V-G-L-E-I-W-S-N-G-D-K-I	38.673	80.683
676	V-G-L-E-I-W-S-N-G-D-K-I-T-V-K	47.587	86.365
677	E-I-W-S-N-G-D-K-I-T-V-K-P-D-V	45.337	88.240
678	S-N-G-D-K-I-T-V-K-P-D-V-D-Y-T	46.135	98.471
679	D-K-I-T-V-K-P-D-V-D-Y-T-L-N-S	46.750	98.144
697	C-H-P-K-R-S-V-A-I-V-E-D-Y-S-P	74.769	113.702
698	K-R-S-V-A-I-V-E-D-Y-S-P-I-N-L	70.481	96.654
705	A-H-E-M-G-H-N-L-G-I-H-H-D-T-D	47.202	53.154
706	M-G-H-N-L-G-I-H-H-D-T-D-F-C-S	52.288	46.635

A primeira sequência identificada A<sup>189</sup>EQQKYNPFYVELFIVVDQG<sup>209</sup>, correspondente aos spots 657 a 659, integra o domínio metaloprotease. O átomo de oxigênio da cadeia lateral da Glu201 juntamente com o da Asn392, dois átomos de oxigênio do Asp 285, grupo carbonila da Cys389 e duas moléculas de água participam na coordenação do íon cálcio, que está relacionado com a estabilização da folha  $\beta$  que contém o n-terminal (131).

Com relação ao epítipo K<sup>222</sup>ARMYELANIVNEILRYL<sup>239</sup>, formado pelos spots 668 e 669, já foi demonstrado que seus anticorpos antipeptídeos possuem capacidade neutralizante da atividade hemorrágica da bothropasina (95).

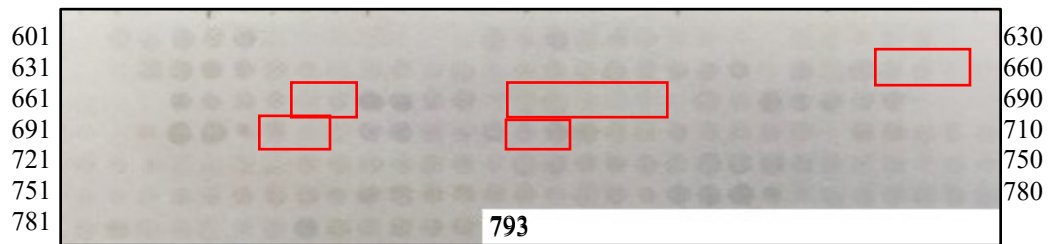
Uma terceira porção bastante reativa, spots 675 a 679, reconhecida tanto por anti-*Bothrops* quanto por IgG antibotrópica, se encontra no domínio metaloprotease, originado uma grande sequência de 27 resíduos, A<sup>243</sup>ALVGLIWSNGDKITVKPDVDYTLNS<sup>269</sup>.

Os spots 697 e 698 formam o segmento C<sup>309</sup>HPKRSVAIVEDYSPINL<sup>326</sup>, que possui uma Cys309 envolvida na estrutura do sítio catalítico na ponte dissulfeto com a Cys389.

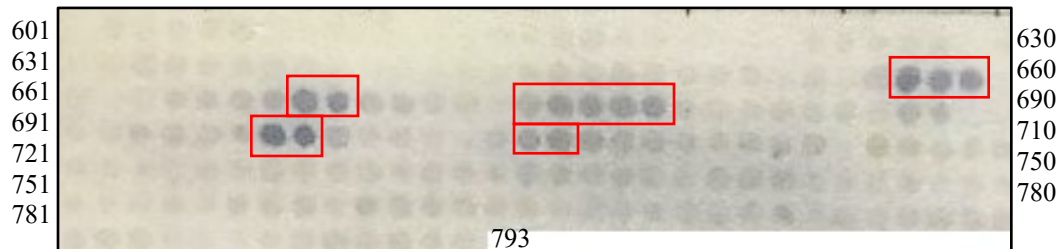
No meio da proteína, distando apenas 6 resíduos do quarto epítipo, encontra-se o quinto segmento, A<sup>333</sup>HEMGHNLGIHHDTFCS<sup>350</sup>, composto pelos peptídeos 705 e 706. Esta região foi pouco reativa, mais evidente ao se usar o anti-*Bothrops* (Figura 22B e 22C). Tal localização é altamente conservada (HEXXHXXGXXH) e juntamente com a estrutura met turn caracteriza os membros da metzincins (132). A arquitetura do sítio ativo da bothropasina possui um íon zinco catalítico coordenado pentaedricamente associado às His334, 338, 344 e 7 cisteínas. Uma destas é a Cys349 (presente no peptídeo 706) que juntamente com a Cys373 forma uma ponte dissulfeto (131).

**Figura 22 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de zinco metaloprotease.** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle - IgG de cavalo não imune na concentração de 35 µg/mL (22A), 2- anti-*Bothrops* na concentração de 35 µg/mL (22B), 3 –IgG antitropical 35 µg/mL (22C). A ligação dos anticorpos antitropicals foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:3000.

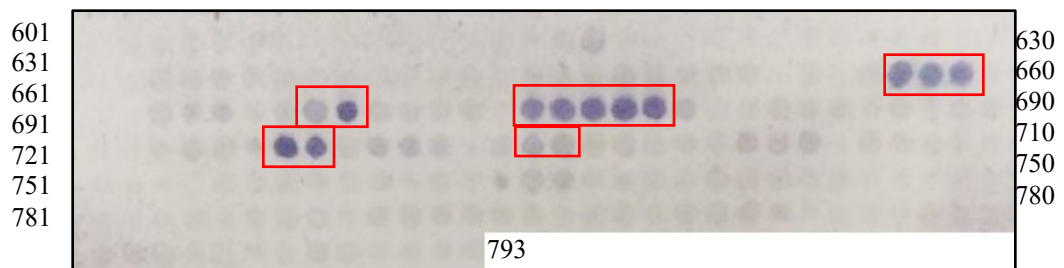
**22A**



**22B**

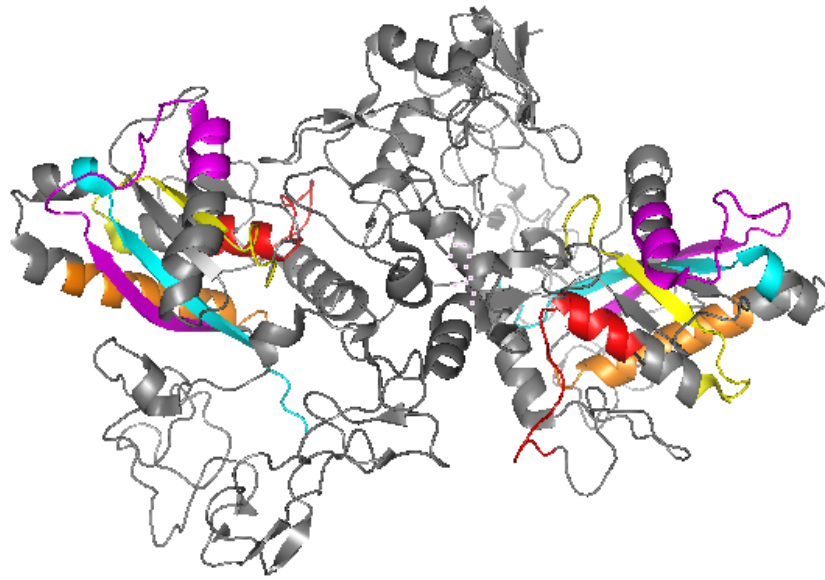


**22C**



Estudos das localizações dos epitopos foram analisados na estrutura tridimensional da bothropasina, Código PDB 3DSL (131) usando o PyMOL Molecular Graphics System (110). As sequências mapeadas foram identificadas em azul (A<sup>189</sup>EQQKYNPF<sub>RYVELFIVVDQG</sub><sup>209</sup>), laranja (K<sup>222</sup>ARMYELANIVNEILRYL<sup>239</sup>), magenta (A<sup>243</sup>ALVGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNS<sup>269</sup>), vermelho (C<sup>309</sup>HPKRSVAIVEDYSPINL<sup>326</sup>) e amarelo (A<sup>333</sup>HEMGHNLGIHHD<sub>TDFCS</sub><sup>350</sup>) (Figura 23).

**Figura 23 - Estrutura 3D da Bothropsina código Uniprot O93523 baseado na estrutura código PDB 3DSL.** Localização dos peptídeos selecionados que reagiram com anti-*Bothrops* no modelo tridimensional de bothropsina em cinza. Em azul, a sequência A<sup>189</sup>EQQKYNPFRYVELFIVVDQG<sup>209</sup>, em laranja a sequência K<sup>222</sup>ARMYELANIVNEILRYL<sup>239</sup>, em magenta a sequência A<sup>243</sup>ALVGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNS<sup>269</sup>, em vermelho a sequência C<sup>309</sup>HPKRSVAIVEDYSPINL<sup>326</sup> e por último em amarelo o segmento A<sup>333</sup>HEMGHNLGIHHDTFCS<sup>350</sup>.



Os segmentos identificados em laranja e magenta são aqueles que se encontram mais expostos na superfície e, portanto, prontamente acessíveis para estabelecer interações com o anticorpo. Destes epitopos, a capacidade antigênica em estimular as células B da sequência (K<sup>222</sup>ARMYELANIVNEILRYL<sup>239</sup>) já foi evidenciada (95).

Portanto, cabe ainda demonstrar que o segmento em magenta (A<sup>243</sup>ALVGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNS<sup>269</sup>), assim como o segmento em laranja, pode induzir a produção de anticorpos relacionados com a neutralização da ação tóxica desta proteína.

O alinhamento entre metaloprotease código Uniprot O93523 de *B. jararaca* e código Uniprot Q2QA02 de *C.d. terrificus* apresenta identidade de 90% e e-value igual a 0, o que pode explicar a redução de intensidade dos anticorpos antibotrópicos ao serem purificados contra o veneno de *C.d. terrificus* (Figura 24), uma vez que combinações maiores que 50% a 70% de identidade ao longo de duas proteínas elevam a probabilidade de indicação de reatividade cruzada potencial ‘*in vitro*’ e / ou relevância clínica (133).

**Figura 24 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da Zinco metaloprotease código Uniprot O93523 de *B. jararaca* e de *C.d. terrificus* código Uniprot Q2QA02.**

Query: sp|O93523|VM3BP\_BOTJA Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothropasin OS=*Bothrops jararaca* Comprimento: 610

Snake venom metalloproteinase; Short=SVMP; Flags: Precursor [*Crotalus durissus durissus*]

Sequência ID: Q2QA02.1 Comprimento: 609

Intervalo 1: 1 a 609

Score:1153 bits (2983), Expect: 0.0

Identities: 549/610(90%), Positivos: 572/610(93%), Gaps: 1/610(0%)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1153 bits(2983)	0.0	Compositional matrix adjust.	549/610(90%)	572/610(93%)	1/610(0%)
Query 1		MIEVLLVTICLAALFYQGSIIIESGNVNDYEVVYPRKVTALPKGAVQPKYEDAMQYEFK			60
Sbjct 1		MI+VLLVTICLAA PYQSSIIIESGNVNDYE+VYPRKVTALPKGAVQPKYEDAMQYE K			60
Query 61		VNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSPDGREITTYPAVEDHCYHGREINDADSTASIS			120
Sbjct 61		VNGEPVVL+LEKNK LFSKDYSETHYSPDGREITTYP VEDHCYHGREINDADSTASIS			120
Query 121		ACNGLKGHFKLQRETYFIEPLKLSNSEAHAVKYENVEKEDAPKMGVTONKSYEPIK			180
Sbjct 121		ACNGLKGHFKLQEMYLEIEPLKLSNSEAHAVKYENVEKEDAPKMGVTONKSYEPIK			180
Query 181		KASQLVVTAEQQKYNPFYVELFIVVDQGMVTKNNGDLKIKARMYELANIVNEILRYLY			240
Sbjct 181		KASQLVVTAE QKYNPFR+VEL +VVD+ HVTKN DLKIK RMYELAN VNEI RY+Y			240
Query 241		MHAALVGLEINSGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKKHDAQLLTAIDFNGPTI			300
Sbjct 241		+H ALVGLEINSN DKITVKP+ YTLN+F EWRKTDLLTRKKHDAQLLTAID + I			299
Query 301		GYAVIGSMCHPKRSVAIVEDYSPINLVAVIMAHMGHNLGIHHDTFCSGGDYPCIMGP			360
Sbjct 301		G AV+GSMCHPKRS I++DYSPINLVAVIMAHMGHNLGIHHD+ +CSGGDY CIM P			359
Query 361		TISNEPSKFFSNCSYIQWDFIMKENPQCILNEPLGTDIVSPPVCGNELLEVGEECDCGT			420
Sbjct 361		IS EPS FFSNCSY WDFIM +NP+CI+NEPLGTDI+SPPVCGNELLEVGEECDCGT			419
Query 421		PENCQNECCDAATCKLKSQSQCQGHGDCEQCKFKSGTECRASMSECDPAEHC TGQSSEC			480
Sbjct 421		PENCQNECCDAATCKLKSQSQCQGHGDCEQCKFKSGTECRASMSECDPAEHC TGQSSEC			479
Query 481		PADVFHKGQPCLDNYGVCYNGNCPIMYHQCYALFGADVVEAEDSCFDKQKGNYYGYCR			540
Sbjct 481		PADVFHKGQPCLDNYGVCYNGNCPIMYHQCY LFGADVVEAEDSCF+ NQKGNYYGYCR			539
Query 541		KENGGKIPCAPEDVKGRGLYCKDNISPGQNNPCKMFYSNDEHKGMLVPGTKCADGKVCSN			600
Sbjct 541		KENG KIPCAPEDVKGRGLYCKDNISPGQNNPCKMFYSN+DEHKGMLVPGTKCADGKVCSN			599
Query 601		GHCVDVATAY 610			
Sbjct 601		GHCVDVATAY 609			



### 5.3.2.2 SNACLEC botrocetina subunidade beta

A botrocetina (SNACLEC botrocetina subunidade beta), inicialmente conhecida como coaglutina (134), é uma proteína que causa a aglutinação de plaquetas e agregação plaquetária com o envolvimento do fator de von Willebrand (vWF) como um cofator necessário. Isolada do veneno de *B. jararaca*, é uma proteína heterodimérica de 31 kDa que forma um complexo solúvel com vWF (52).

A síntese de 38 peptídeos em membrana de celulose, cobrindo a estrutura primária da botrocetina código Uniprot P220230, resultou na reatividade dos spots 942 a 944 frente ao anti-*Bothrops* e a IgG antibotrópica representados na tabela 8.

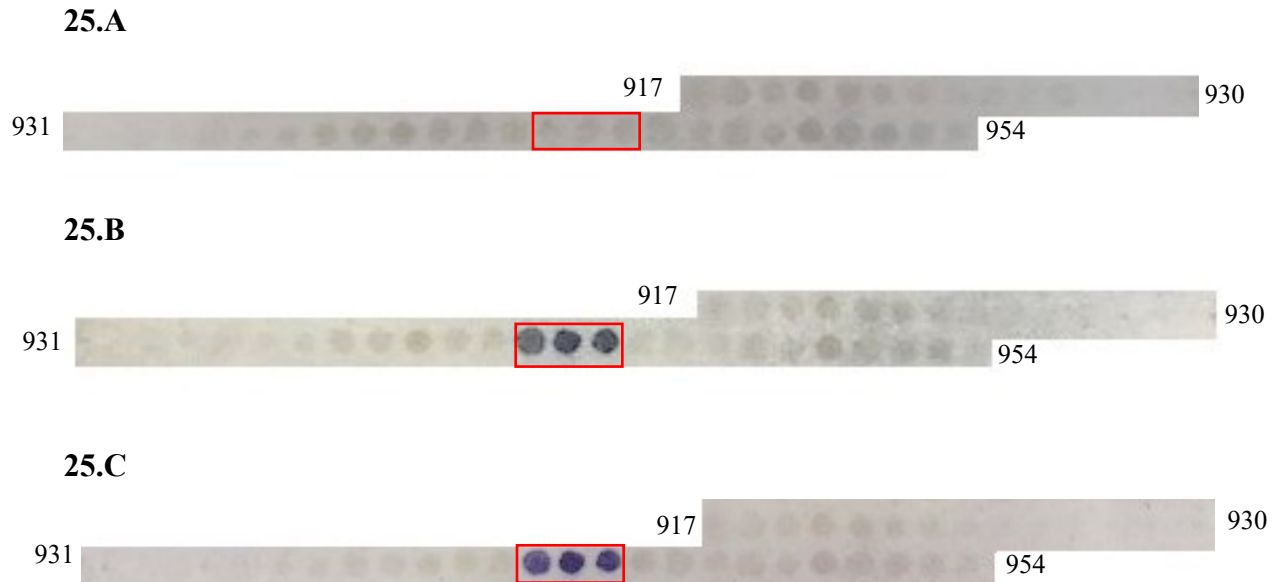
Ambos os spots apresentaram semelhante intensidade de reação frente aos dois tipos de amostras utilizadas. Ademais, dentre as toxinas avaliadas do veneno de *B. jararaca*, a botrocetina foi a mais intensamente reconhecida (Tabela 8, Figuras 25B e 25C).

**Tabela 8 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos da sequência de aminoácidos de SNACLEC botrocetina  $\beta$  (código Uniprot P22030) reconhecidos por anticorpos antibotrópicos.** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica.

A	Sequência		
	B	C	D
Spot	Sequência	Anti- <i>Bothrops</i>	IgG antibotrópica
P22030	DCPPDWSSYEGHCYRFFKEWMHWDDAEFCTEQQTGAHLVSFQSKEEADFVRSLTSEMLK GDVWVWIGLSDVWNKCR <sup>76</sup> FEWTDGMEFDYDDYYLIAEY <sup>96</sup> ECVASKPTNNKWWIIPCTRFKNFV CEFQA		
942	R-F-E-W-T-D-G-M-E-F-D-Y-D-D-Y	90.933	107.990
943	W-T-D-G-M-E-F-D-Y-D-D-Y-Y-L-I	100.712	115.260
944	G-M-E-F-D-Y-D-D-Y-Y-L-I-A-E-Y	96.212	101.933

O segmento resultante dos spots reativos é R<sup>76</sup>FEWTDGMEFDYDDYYLIAEY<sup>96</sup>, possui diversos aminoácidos envolvidos na formação da superfície carregada negativamente da botrocetina que desempenha papel principal em sua associação com o domínio A1 de vWF. Além disso, o alinhamento da sequência baseado na estrutura da botrocetina, com fator de coagulação IX/X-BP, fator de coagulação IX-BP, e flavocetina revelam uma similaridade estrutural com as proteínas heterodiméricas da superfamília da Lectina tipo - C, e compartilham alto grau de sequências similares envolvendo principalmente os resíduos Glu78, Asp81, Glu84 e Asp86 (52).

**Figura 25 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de SNACLEC botrocetina  $\beta$ .** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle - IgG de cavalo não imune na concentração de 35  $\mu\text{g/mL}$  (25A), 2- anti-*Bothrops* na concentração de 35  $\mu\text{g/mL}$  (25B), 3 –IgG antibotrópica 35  $\mu\text{g/mL}$  (25C). A ligação dos anticorpos antibotrópicos foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:3000.



A análise do segmento R<sup>76</sup>FEWTDGMEFDYDDYYLIAEY<sup>96</sup> da SNACLEC botrocetina  $\beta$  código Uniprot P22030 quando alinhado com SNACLEC crotocetina de veneno de *C.d. terrificus* código Uniprot Q719L8 (Figura 26) demonstra a ausência nesta de resíduos Asp81 e Glu84, similares entres outras lectinas do tipo C (52).

A ausência dos dois resíduos ácidos no segmento similar da crotocetina podem ser importantes para a ligação dos anticorpos antibotrópicos, por tal motivo não seriam removidos no processo de imunopurificação na coluna contendo veneno de *C.d. terrificus*. O mesmo segmento foi analisado em outras SNACLEC de *C.d. terrificus* sendo que Convulxina subunidade beta código Uniprot O93427 possui 2 resíduos ácidos e Convulxina subunidade alfa código Uniprot O93426 apenas 1, em comparação com os 4 da botrocetina.

Figura 26 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da SNACLEC botrocetina beta código Uniprot P22030 de *B. jararaca* e SNACLEC crotocetina de *C.d. terrificus* código Uniprot q719L8, representado no programa Jalview versão 2.11.0

Query: None Query ID: lc|Query\_61244 Comprimento: 125

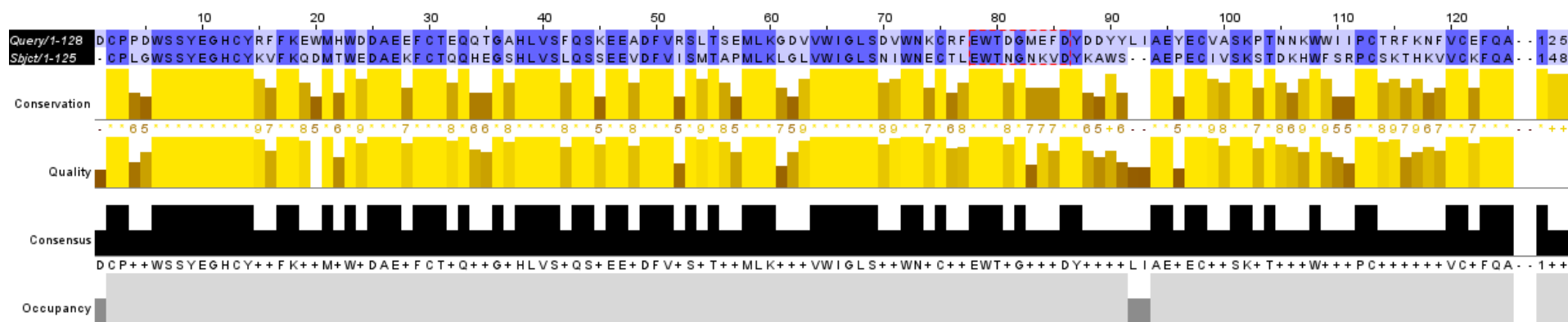
RecName: Full=Snaclec crotocetin; Short=CRC; Flags: Precursor [*Crotalus durissus terrificus*]

Sequência ID: Q719L8.1 Comprimento: 148

Intervalo 1: 27 a 148

Score:149 bits (376), Expect:6e-49,

Identidade: 69/124 (56%), Positivos:90/124 (72%), Gaps:2/124(1%)



### 5.3.2.3 Fosfolipase A2

A Fosfolipase A2 (PLA2) de *B. jararaca* código Uniprot P81243 possui uma cadeia com 124 resíduos, que ao ser sintetizada como peptídeos de 15 resíduos, janela de 3, resultou em uma membrana com 38 spots (Figura 27). Três spots, 1155 a 1157, foram reconhecidas por anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica, porém com baixa contagem de pixels (Tabela 9) e semelhantes entre si.

**Tabela 9 - Conjunto de pentadecapeptídeos sobrepostos em janela de três resíduos correspondentes à sequência de aminoácidos de PLA2 código Uniprot P81243 reconhecidos por anticorpos antibotrópicos.** Coluna A refere-se ao número correspondente ao spot na membrana. Coluna B é a sequência de resíduos dos peptídeos. Coluna C e D número de pixels da reação entre peptídeo e anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica.

<b>P81243</b>	Sequência DLWQFGQMMNDVMREYVVFNYLYYGICYCGWGGIGKPRDATDRCCFVHDCCYGKVTGCN <sup>58</sup> PK TDSYTYTYSEENGDVVCG <sup>78</sup> GDDLCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDTKYWLYGAKNCQEE SEPC		
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Spot</b>	<b>Sequência</b>	<b>Anti-<i>Bothrops</i></b>	<b>IgG antibotrópica</b>
1155	N-P-K-T-D-S-Y-T-Y-T-Y-S-E-E-N	39.923	42.740
1156	T-D-S-Y-T-Y-T-Y-S-E-E-N-G-D-V	66.298	64.587
1157	Y-T-Y-T-Y-S-E-E-N-G-D-V-V-C-G	70.000	73.317

O epitopo linear identificado como N<sup>58</sup>PKTDSYTYTYSEENGDVVCGG<sup>78</sup>, possui a Cys77 que forma ponte dissulfeto com a Cys88.

**Figura 27 - Reatividade de peptídeos de 15-mer derivados da sequência de aminoácidos de PLA2.** A membrana foi ensaiada com 1 – Controle - IgG de cavalo não imune na concentração de 35 µg/mL (27A), 2- anti-*Bothrops* na concentração de 35 µg/mL (27B), 3 –IgG antitoxinotrópica 35 µg/mL (27C). A ligação dos anticorpos antitoxinotrópicos foi revelada utilizando-se anticorpo de ovelha anti-cavalo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:3000.



A análise das sequências alinhadas de PLA2 código Uniprot P81243 de *B. jararaca* e de *C.d terrificus* código Uniprot 2QOG apresentam identidade 54% (e-value  $1e^{-44}$ ) (Figura 28) e, portanto, os anticorpos contra essa toxina de ambos organismos poderiam apresentar reatividade cruzada (133).

**Figura 28 - Alinhamento realizado na plataforma Blast da PLA2 código Uniprot P81243 de *B. jararaca* e de Crotoxina B de *C.d. terrificus* código Uniprot 2QOG, representado no programa Jalview versão 2.11.0.**

Query: sp|P81243|PA2A\_BOTJA Acidic phospholipase A2 OS=*Bothrops jararaca* OX=8724 PE=1 SV=1 Query ID: lcl|Query\_88493

Comprimento: 124

>Chain A, Crotoxin B, The Basic PLA2 de *Crotalus durissus terrificus*

Sequência ID: 2QOG\_A Comprimento: 122

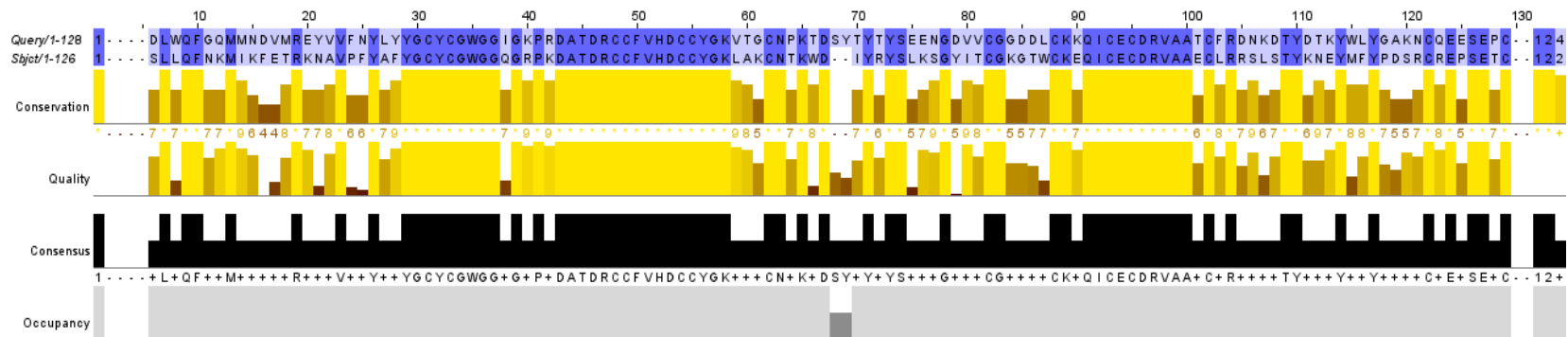
>Chain D, Crotoxin B, The Basic PLA2 de *Crotalus durissus terrificus*

Sequência ID: 2QOG\_D Comprimento: 122

Intervalo 1: 1 a 122

Score: 134 bits(337), Expect:2e-43,

Identicidades: 67/124(54%), Positivos: 81/124(65%), Gaps: 2/124(1%)



Para concluir, a partir dos estudos de mapeamento de epitopos lineares do veneno de *B. jararaca* com anti-*Bothrops* e IgG antitoxinogênica identificaram-se que as toxinas mais intensamente reconhecidas foram zinco metaloprotease, SNACLEC e PLA2, de acordo com a tabela 10.

**Tabela 10 - Sequência primária dos peptídeos mapeados de toxinas do veneno de *B. jararaca*.**

Proteína	Código	Número Spot	Sequência	Nº resíduos	PM	PI
Zinco metaloprotease	O93523	657 a 659	A <sup>189</sup> EQQKYNPFRYVELFIVVDQG <sup>209</sup>	21	2543,86	4,68
		668 e 669	K <sup>222</sup> ARMYELANIVNEILRYL <sup>239</sup>	18	2209,63	8,5
		675 a 679	A <sup>243</sup> ALVGLIWSNGDKITVKPDVDYTLNS <sup>269</sup>	27	2919,28	4,23
		697 e 698	C <sup>309</sup> HPKRSVAIVEDYSPINL <sup>326</sup>	18	2041,2022	6,74
		705 e 706	A <sup>333</sup> HEMGHNLGIHHDTFCS <sup>350</sup>	18	021,17	5,57
SNACLEC botrocetina α	P22030	942 a 944	R <sup>76</sup> FEWTDGMEFDYDDYYLIAEY <sup>96</sup>	21	2741,92	3,62
PLA2	P81243	1155 a 1157	N <sup>58</sup> PKTDSYTYTYSEENGDVVCG <sup>78</sup>	21	2342,43	3,92

Considerando a relevância das toxinas na composição do veneno de *B. jararaca* (14), na quais 25,2% é composto por metaloprotease tipo III; 9,3% de moléculas de lectina tipo - C e 3,7% de PLA2, associada com o mapeamento de peptídeos que possuem resíduos relacionados a manutenção da estrutura proteica e sua atividade tóxica, conclui-se que estudos adicionais com peptídeos sintéticos e seu potencial antigênico ainda precisam ser investigados.

## 5.4 Imunização de coelhos com lipossomas incorporados com epitopos previamente identificados

### 5.4.1 Peptídeos solúveis

A partir da análise dos spots da membrana de veneno de *C.d. terrificus*, conclui-se que os anticorpos imunopurificados, *anti-C.d. terrificus*, utilizados como ferramentas biotecnológicas no mapeamento de epitopos específicos, reconheceram mais intensamente os epitopos lineares de crotamina e da PLA2, do que outros anticorpos anticrotálicos. Tais toxinas estão em elevada concentração no veneno de *C.d. terrificus* (13) e são relevantes no quadro de envenenamento, por isso, os peptídeos a elas relacionados foram sintetizados com 21 resíduos.

Na tabela 11, consta os nomes dos peptídeos e sequências selecionados, proteína de origem, código Uniprot, número do spot na membrana, peso molecular e ponto isoelétrico. Todos os peptídeos possuem entre cinco e sete resíduos carregados o que lhes confere a propriedade de serem hidrossolúveis.

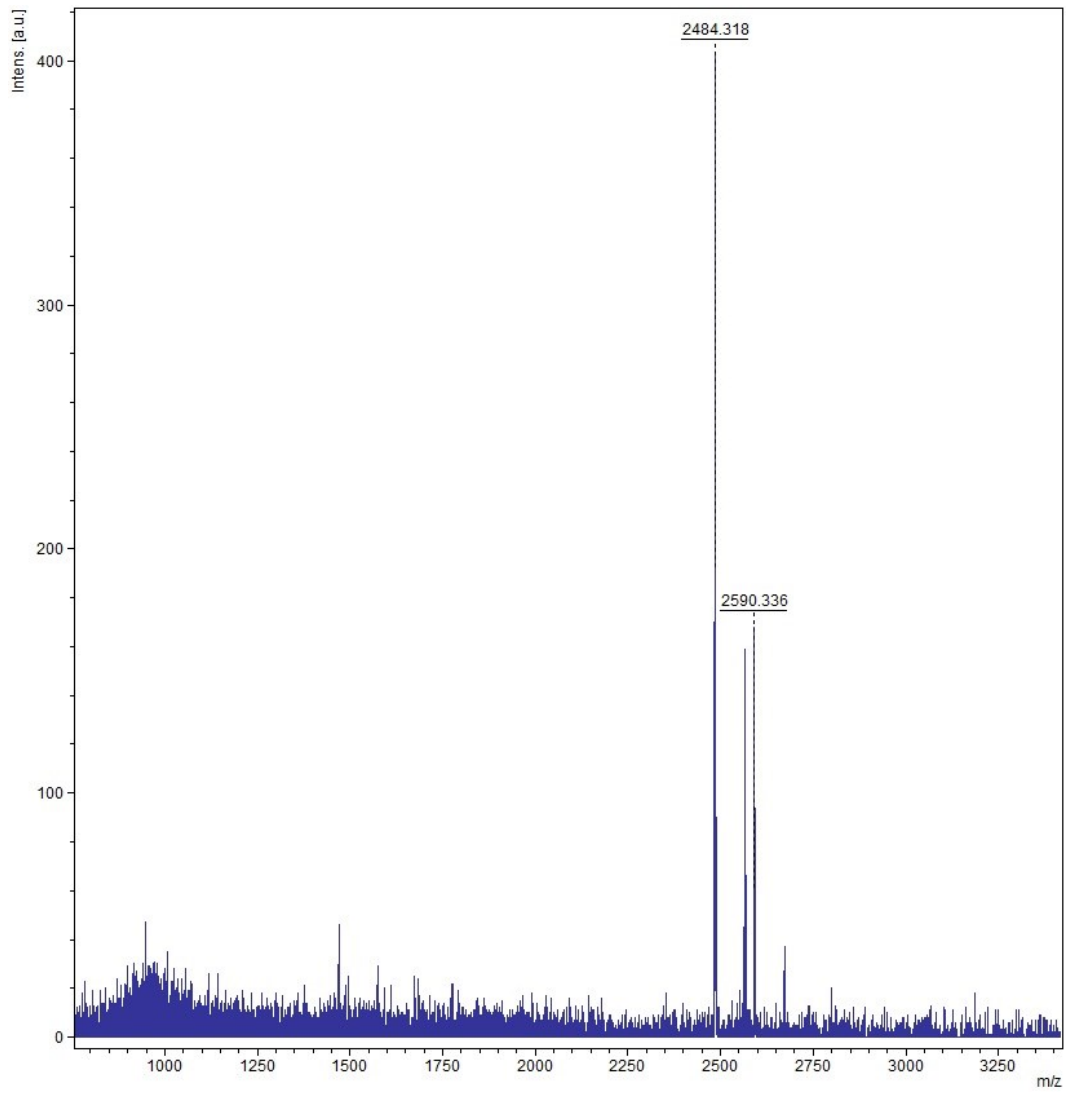
**Tabela 11 - Sequência primária dos peptídeos solúveis de toxinas de veneno de *C.d. terrificus*.**

Nome Peptídeo	Proteína	Código	Número Spot	Sequência	PM	PI
Crotam1	Crotamina	Q9PW3	10,11 e 12	F <sup>12</sup> PKEKICLPPSSDFGKMDCRW <sup>32</sup>	2484,93	8.03
Ctx2	Crotoxina B	P62022	4,5 e 6	L <sup>10</sup> LVGVEGHLLQFNKMIKFETR <sup>30</sup>	2472,97	8.6
Ctx3	Crotoxina B	P62022	15,16 e 17	Y <sup>43</sup> CGWGGRGRPKDATDRCCFVH <sup>63</sup>	2384,69	8.68
Ctx4	Crotoxina B	P62022	40,41 e 42	T <sup>118</sup> YKYGYMFYPDSRCRGPSETC <sup>138</sup>	2524,82	7.69

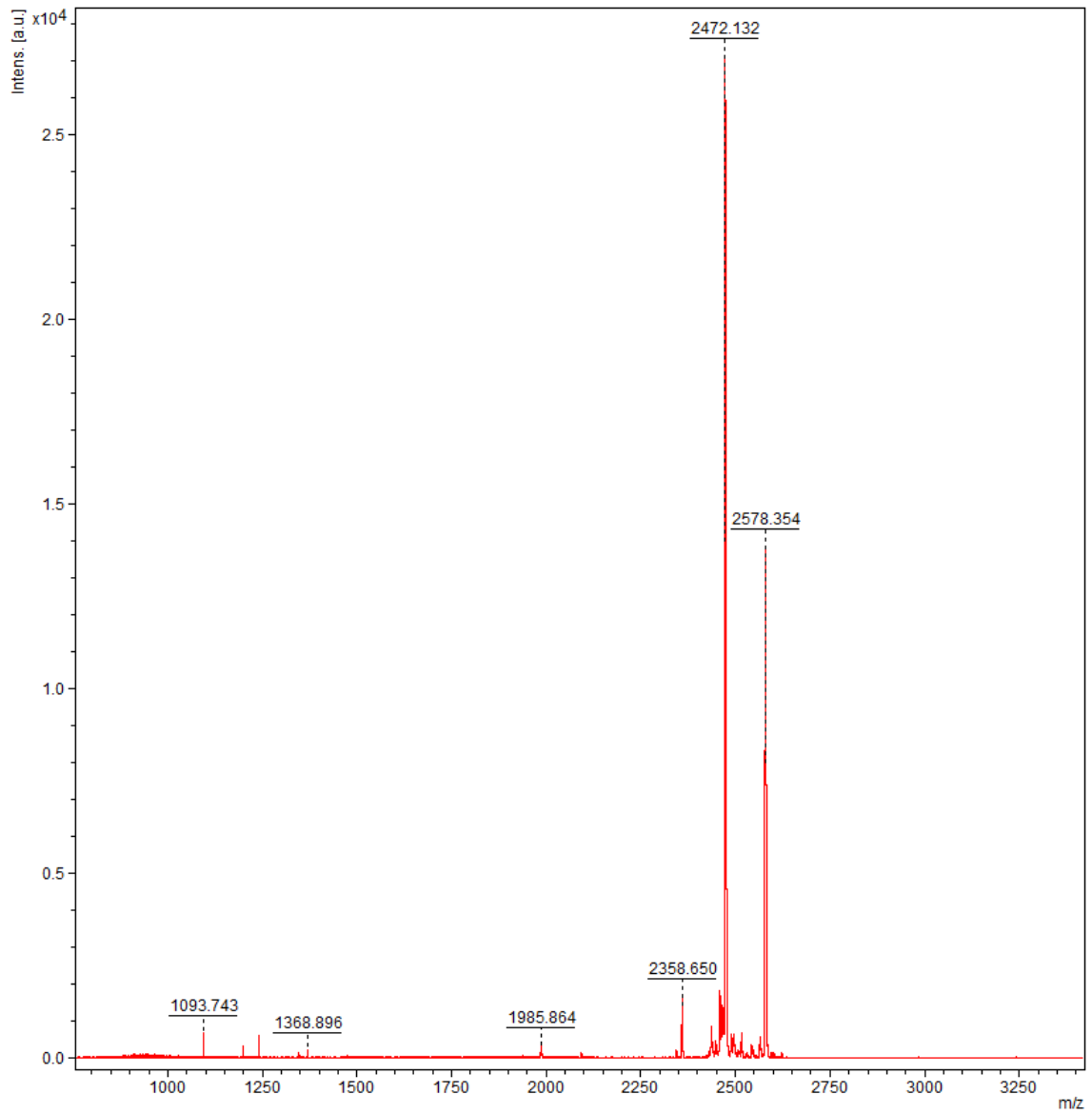
A espectrometria de massas foi realizada a fim de verificar se os peptídeos sintetizados possuíam o peso molecular esperado, conforme figuras 29 a 32.



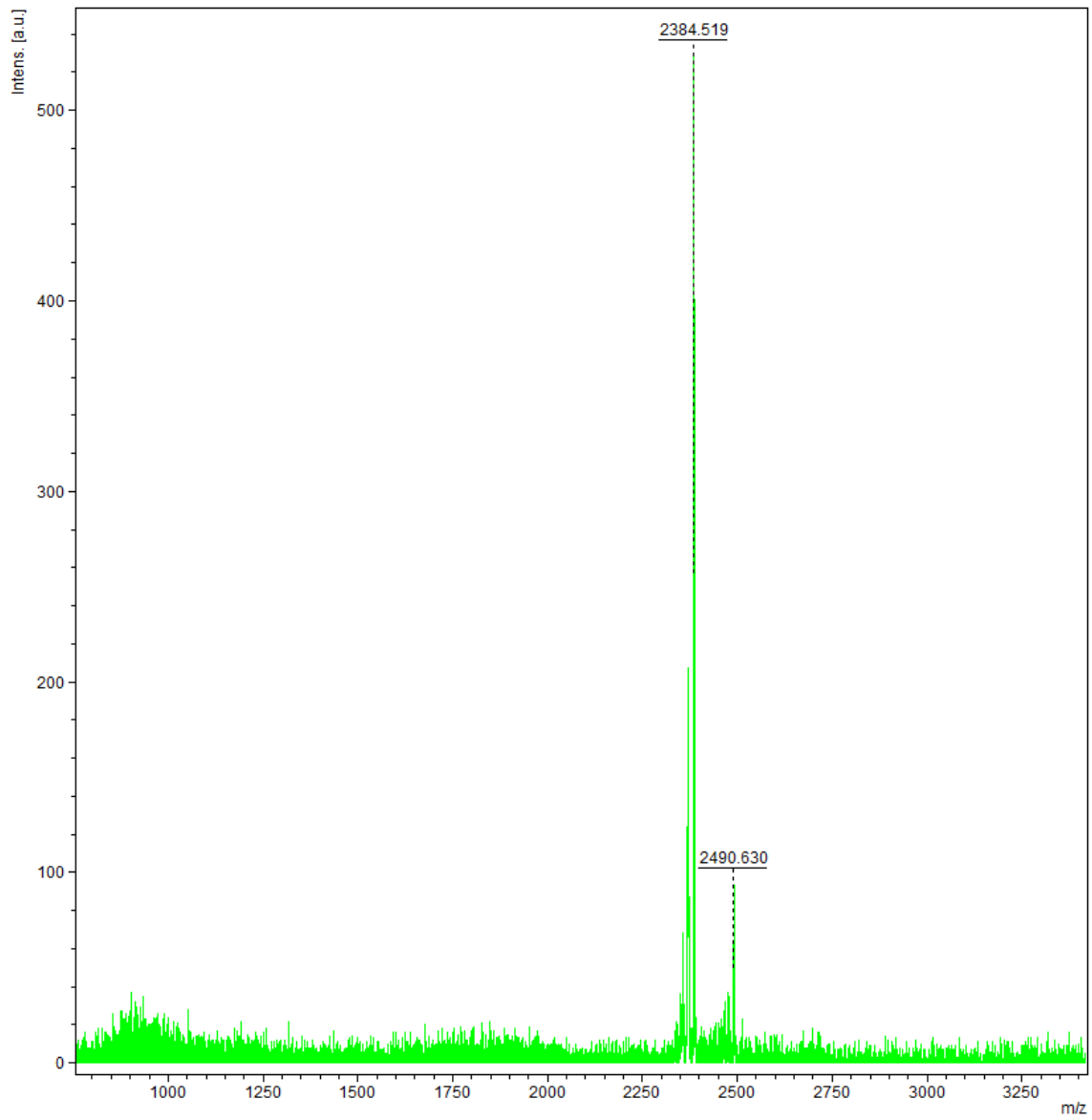
**Figura 29 - Espectro de massas do Crotam1.** A massa molecular esperada de Crotam1, oriundo da crotamina é de 2484,93 kDa.



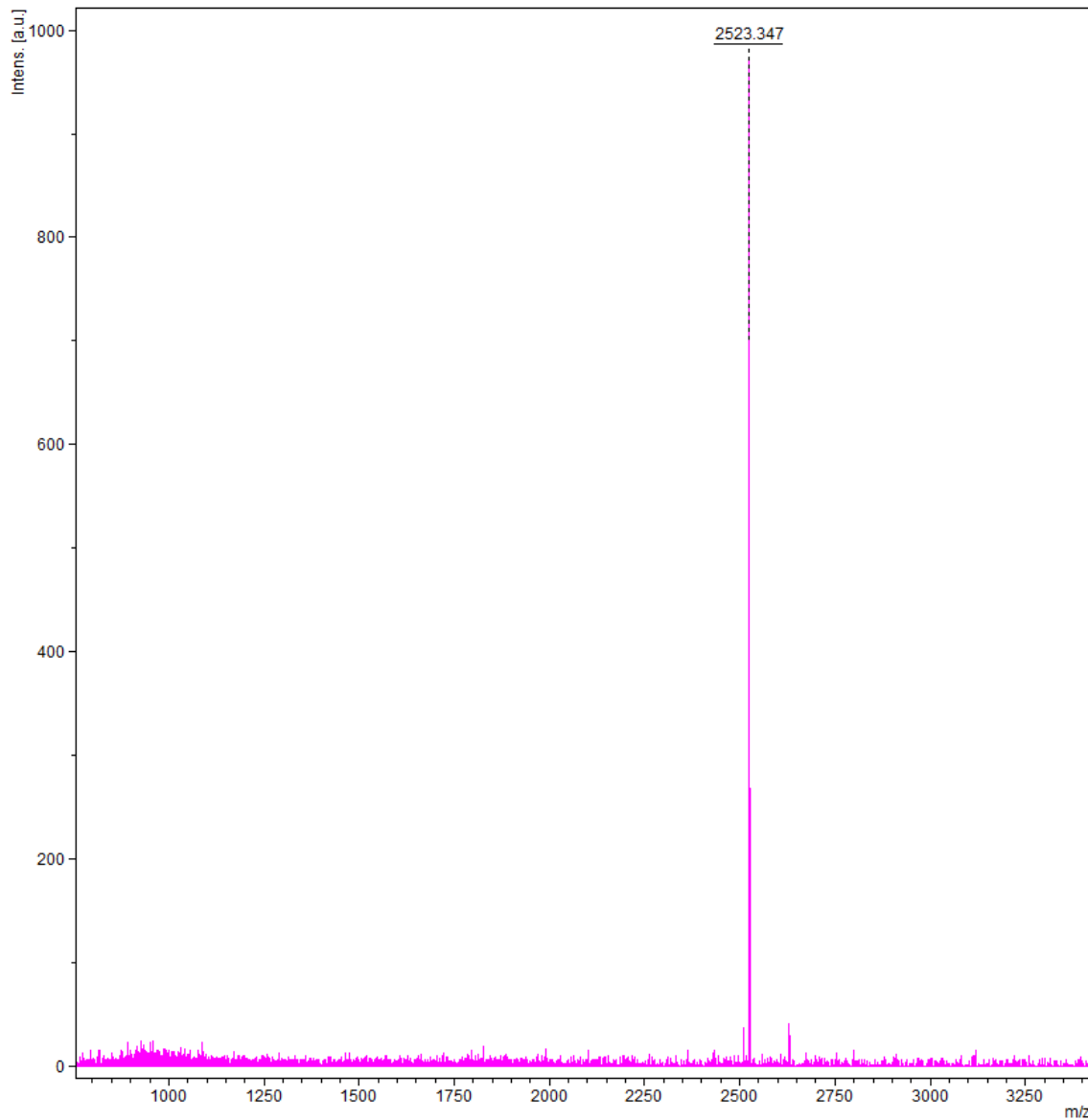
**Figura 30 - Espectro de massas do Ctx2.** A massa molecular esperada do Ctx2, oriundo da crotoxina B é de 2472,97 kDa.



**Figura 31 - Espectro de massas do Ctx3.** A massa molecular esperada do Ctx3, oriundo da crotoxina B é de 2384,69 kDa.



**Figura 32 - Espectro de massas do Ctx4.** A massa molecular esperada do Ctx4, oriundo da PLA2 é de 2524,82 kDa.



Com base nos espectros, conclui-se que a síntese das sequências de Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4 foi alcançada, uma vez que foram recuperadas as massas moleculares calculadas.

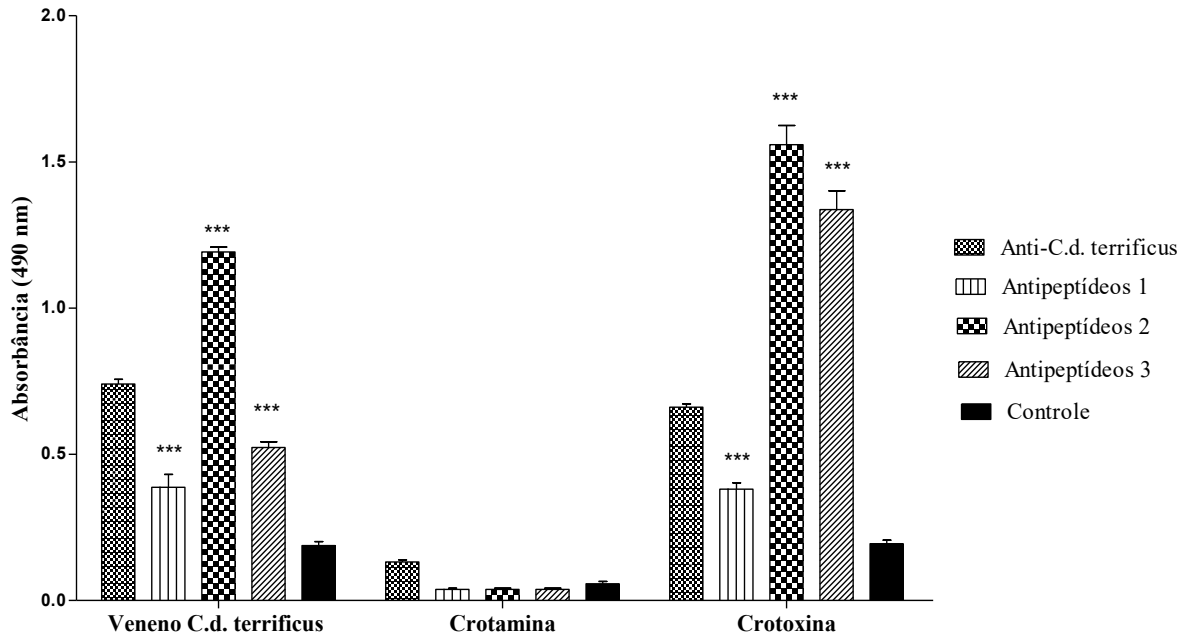
Para investigar o potencial imunogênico dos epitopos sintetizados, como alternativa em substituição ao veneno bruto na produção de antiveneno, os peptídeos foram incorporados a lipossomas constituídos de L- $\alpha$ -lecitina e colesterol. O emprego de lipossomas tem por objetivo não só proteger do ambiente os peptídeos, que por serem pequenos podem rapidamente ser eliminados do organismo, como também, reduzir sua estabilidade em solução (97).

### **5.5 Avaliação do reconhecimento dos antipeptídeos contra as toxinas e os peptídeos de origem**

Ensaio de ELISA indireto foram conduzidos com antipeptídeos produzidos a partir dos ciclos de imunização de um coelho com lipossomas (controle) e outros três com lipossomas incorporados com a mistura de peptídeos sintéticos (Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4).

Sequencialmente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg/mL de crotamina, crotoxina e veneno de *C.d. terrificus* para avaliar a habilidade de reconhecimento dos antipeptídeos diluídos 1:100 frente aos antígenos de onde foram localizados. Anticorpos anti-*C.d. terrificus* produzidos contra o veneno bruto também foram ensaiados na concentração de 2,5 µg/mL.

**Figura 33 - ELISA indireto, ligação de antipeptídeos e anti-*C.d. terrificus* a crotamina, crotoxina e veneno de *C.d. terrificus*.** A microplaca foi sensibilizada com 5 µg/mL de crotamina, crotoxina e veneno *C.d. terrificus* e ensaiada com 2,5 µg/mL de anti-*C.d. terrificus* e antipeptídeos dos coelhos 1,2 ou 3 e soro do coelho 4 diluídos 1:100. A habilidade de reconhecimento dos antipeptídeos 1, 2 e 3 à crotoxina e veneno de *C.d. terrificus* é estatisticamente diferente da capacidade exibida pelo controle (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão da absorbância em 490 nm.



O gráfico demonstra que a habilidade de reconhecimento dos antipeptídeos 1, 2 e 3 à crotoxina e veneno de *C.d. terrificus* é estatisticamente diferente da capacidade exibida pelo controle (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). O soro do coelho controle foi incapaz de reconhecer veneno ou proteínas, resultando em absorbâncias que não excederam 0,195 (Figura 33).

Anti- *C.d. terrificus* ligou-se ao veneno de *C.d. terrificus* e crotoxina com uma absorbância de  $0,741 \pm 0,016$  (absorbância média  $\pm$  desvio padrão) e  $0,661 \pm 0,011$ ; respectivamente. O reconhecimento de crotamina foi de  $0,131 \pm 0,008$ , sendo menos intenso que o observado para o veneno e crotoxina (Figura 33), mesmo sendo o veneno crotamina positivo.

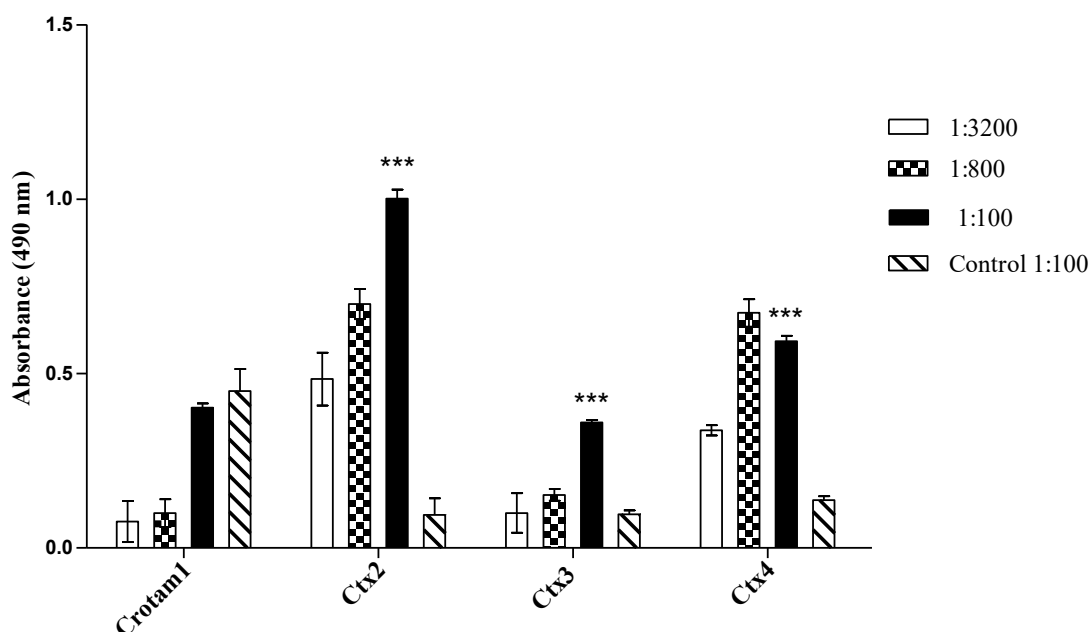
O mesmo padrão foi observado para os antipeptídeos 2 resultando em absorbância de  $1,559 \pm 0,065$  para crotoxina,  $1,192 \pm 0,017$  para o veneno. Para os antipeptídeos 3, absorbância de  $1,338 \pm 0,064$  para crotoxina e  $0,523 \pm 0,019$  para o veneno. Por outro lado, os antipeptídeos

1 apresentaram resposta semelhante para Ctx  $0,3814 \pm 0,022$  quando comparado ao veneno  $0,388 \pm 0,044$ , enquanto que o reconhecimento de crotamina gerou sinal de  $0,038 \pm 0,003$  (Figura 33).

Portanto, todos os anti-peptídeos foram capazes de se ligar ao veneno de *C.d. terrificus* e à crotalina, porém o mesmo não foi confirmado para a crotamina. A principal diferença entre os anti-peptídeos 1 e os anti-peptídeos 2 e 3 é que o primeiro é resultante de 7 imunizações, enquanto os demais 9. Além disso, a heterogeneidade das intensidades nas respostas também é devido às individualidades dos animais imunizados que podem gerar anticorpos com maior ou menor afinidade.

Para evidenciar que a ligação dos anti-peptídeos era resposta específica, uma placa de ELISA foi dividida em 4 partes, e cada uma sensibilizada com um peptídeo na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ . O controle foi diluído 1:1000 enquanto os anti-peptídeos 1 foram diluídos em títulos de 1:100; 1:800 e 1:3200.

**Figura 34 - ELISA indireto, ligação de anti-peptídeos e peptídeos Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4.** A microplaca foi sensibilizada com 10 µg/mL de cada peptídeo e ensaiada com soro controle diluído 1:100 e anti-peptídeos diluídos 1:100; 1:800 e 1:3200. Os anti-peptídeos se ligam de maneira significativamente distinta aos peptídeos em comparação com o controle (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão da absorbância em 490 nm.



Em relação à capacidade de reconhecimento dos anti-peptídeos, foi mais intenso para Ctx2  $1,002 \pm 0,026$  que o controle  $0,095 \pm 0,048$ , Ctx4  $0,593 \pm 0,015$  que o controle  $0,096 \pm 0,011$  e Ctx3  $0,360 \pm 0,007$  que o controle  $0,137 \pm 0,011$ , decrescendo nesta ordem; demonstrando que os anti-peptídeos se ligam de maneira significativamente distinta aos peptídeos em comparação com o controle (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) (Figura 33).

Os anti-peptídeos não reconheceram o Crotam1 (Figura 34), confirmando os resultados do ensaio de ELISA (Figura 33) no qual, tais anticorpos, também não foram capazes de se ligar à crotamina. Assim, deduz-se que o peptídeo sintético Crotam1 não foi competente em induzir a produção de imunoglobulinas contra si.

É geralmente aceito que altos títulos de anticorpos anti-peptídeos com reação cruzada com a proteína progenitora será obtido se a conformação do peptídeo imunógeno se assemelha ao segmento correspondente da proteína nativa. Porém, é impossível prever qual conformação adotada pelo peptídeo quando ele se encontra com os receptores de células B, no momento crucial, em que desencadeia a produção de anticorpos (135).



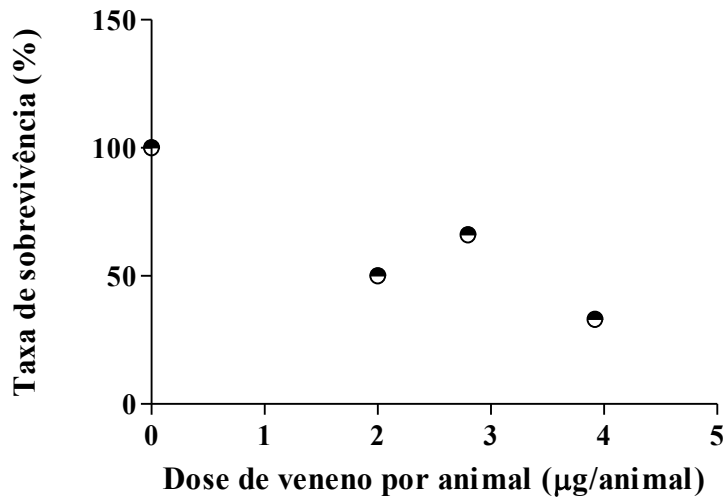
Já no que tange a especificidade, constata-se que a medida que o título de anti-peptídeos diminui ocorre um decaimento nas absorvâncias, o que permite depreender que se trata de uma condição resposta-específica entre antígenos e anticorpos (Figura. 34).

Posto que, foi comprovado que os anti-peptídeos possuem a habilidade de reconhecer veneno de *C.d. terrificus*, crotoxina, e de maneira específica os peptídeos que lhes deram origem, cabe comprovar a capacidade destas imunoglobulinas de neutralizar a atividade letal do veneno.

### **5.6 Avaliação da ação neutralizante dos anti-peptídeos sob a letalidade do veneno de *C.d. terrificus***

Para conduzir os ensaios de neutralização, definiu-se a DL50 por meio de ensaios com 4 grupos de 6 camundongos, aplicando intraperitoneal 100 µL de PBS; 2,0; 2,8 ou 3,92 µg de veneno de *C.d. terrificus*.

Figura 35 - Determinação da DL50 do veneno de *C.d. terrificus*.



O grupo que recebeu apenas PBS apresentou taxa de sobrevivência de 100%, enquanto que o que recebeu dose de 2,8 µg de veneno de *C.d. terrificus* foi de 66,6% e o que recebeu 3,92 µg de veneno foi de 33,3% (Figura 35).

Visto que, três indivíduos do grupo de seis camundongos, que receberam a dose de 2,0 µg de veneno *C.d. terrificus* sobreviveram, esta dose foi considerada a DL50 (Figura 35).

Para demonstrar a eficácia dos anti-peptídeos em neutralizar a letalidade do veneno total, os anti-peptídeos foram diluídos 1:4 e 1:2 com PBS, misturados com 7 LD50 de veneno de *C.d. terrificus*, pré-incubados por 1 hora a 37°C e injetados intraperitonealmente em camundongos. A taxa de sobrevivência resultante, nas diluições 1:4 e 1:2, foi respectivamente de 8% e 42% com anti-peptídeos do coelho 1; 33% e 50% do coelho 2 e 16% e 50% do coelho 3. A taxa de sobrevivência ao se misturar 200 µL de soro de animal controle com a mesma dose de veneno foi de 0%. (Tabela 12).

**Tabela 12 - Neutralização da atividade letal de veneno *C.d. terrificus* em camundongos pelo soro anti-peptídico.** Cada camundongo recebeu intraperitonealmente (i.p.) 0,2 mL de uma solução contendo 7 DL50 (14 µg) de *C.d. terrificus* em PBS, misturado com 100 µL de anti-peptídeos (diluição 1: 2) do Coelho 1, 2 ou 3; 50 µL de anti-peptídeos (diluição 1: 4) do Coelho 1,2 ou 3 ou 200 µL de controle. A taxa de sobrevivência foi medida durante 48 h após a injeção.

	Tempo (h)				
	0	12	24	36	48
	<b>Sobrevivência%</b> (Nº de animais sobreviventes/nºtotal de animais)				
PBS	100 (6/6)	33 (2/6)	16 (1/6)	16 (1/6)	16 (1/6)
Controle	100 (12/12)	25 (3/12)	0 (0/12)	0 (0/12)	0 (0/12)
Antipeptídeos diluídos 1:4 (Coelho 1)	100 (12/12)	8 (1/12)	8 (1/12)	8 (1/12)	8 (1/12)
Antipeptídeos diluídos 1:4 (Coelho 2)	100 (6/6)	33 (2/6)	33 (2/6)	33 (2/6)	33 (2/6)
Antipeptídeos diluídos 1:4 (Coelho 3)	100 (6/6)	16 (1/6)	16 (1/6)	16 (1/6)	16 (1/6)
Antipeptídeos diluídos 1:2 (Coelho 1)	100 (12/12)	17 (2/12)	8 (1/12)	8 (1/12)	8 (1/12)
Antipeptídeos diluídos 1:2 (Coelho 2)	100 (6/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)
Antipeptídeos diluídos 1:2 (Coelho 3)	100 (6/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)

Como o grupo de camundongos que recebeu veneno de *C.d. terrificus* misturado com anticorpos do grupo controle não sobreviveu ou, recebeu PBS com veneno teve baixa taxa de sobrevivência em relação ao grupo que recebeu veneno de *C.d. terrificus* com anti-peptídeos diluídos 1:4 e 1:2, conclui-se que os anti-peptídeos possuem atividade neutralizante, pois foram capazes de reduzir a atividade letal causada pelo veneno da espécie citada.

Uma vez que a eficiência de neutralização da atividade letal do veneno de *C.d. terrificus* pelo anti-peptídeos foi evidenciada, depreende-se que a utilização de anticorpos *anti-C.d. terrificus*, imunopurificados por afinidade foram ferramentas biotecnológicas essenciais, que permitiram mapear com assertividade, as toxinas e seus epítopos relevantes para o quadro de envenenamento por essa serpente.

Ademais, é necessário citar, que a qualidade dos anti-peptídeos é dependente também do sucesso da síntese peptídica, da incorporação peptídica aos lipossomas, da resposta imune humoral do animal hospedeiro, do adjuvante selecionado, da dose peptídica administrada, do método de injeção e da purificação dos anticorpos (136).

Além disso, uma medida para incrementar a qualidade dos antipeptídeos (anti-Crotam1, anti-Ctx2, anti-Ctx3 e anti-Ctx-4) seria ao menos uma etapa de precipitação das imunoglobulinas do soro, bem como é executado na produção dos antivenenos comerciais (87).

## **DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE AGLUTINAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL “*in vitro*”, DOS VENENOS DE *Bothrops* spp. E *C.d. terrificus* UTILIZANDO OS ANTI-*C.d. terrificus* e ANTI-*Bothrops***

### **5.7 Selecionar as partículas e o método de acoplamento com os anticorpos imunopurificados**

Após a comprovação de que os anti-*C.d. terrificus* possuíam minimizada reatividade cruzada contra pool de veneno de *Bothrops* (Figura 9) sem comprometimento do reconhecimento do veneno de *C.d. terrificus* (Figura 11), assim como anti-*Bothrops* apresentou uma redução de reatividade cruzada com veneno de *C.d. terrificus* sem prejudicar sua habilidade de ligação ao pool de veneno do gênero *Bothrops*, tais imunoglobulinas foram utilizadas como matéria-prima para desenvolver um método de aglutinação para diagnóstico “*in vitro*” dos venenos de *Bothrops* spp e *C.d. terrificus*.

#### **5.7.1 Seleção do tamanho e natureza das micropartículas**

Na estratégia racional de desenvolvimento de métodos de aglutinação, o primeiro passo é a seleção do tamanho e natureza das micropartículas (MP) de poliestireno, conseqüentemente definindo o modelo de acoplamento utilizado.

Para ensaios de aglutinação visíveis é recomendado que seja selecionado MP de 200 a 900 nm (137). O modelo de acoplamento escolhido foi adsorção passiva, uma vez que se trata do método original para ligação de proteínas a microesferas hidrofóbicas é simples e flexível, pois para anexar o ligante de interesse às microesferas é necessário apenas incubar os dois juntos por um período de tempo (72).

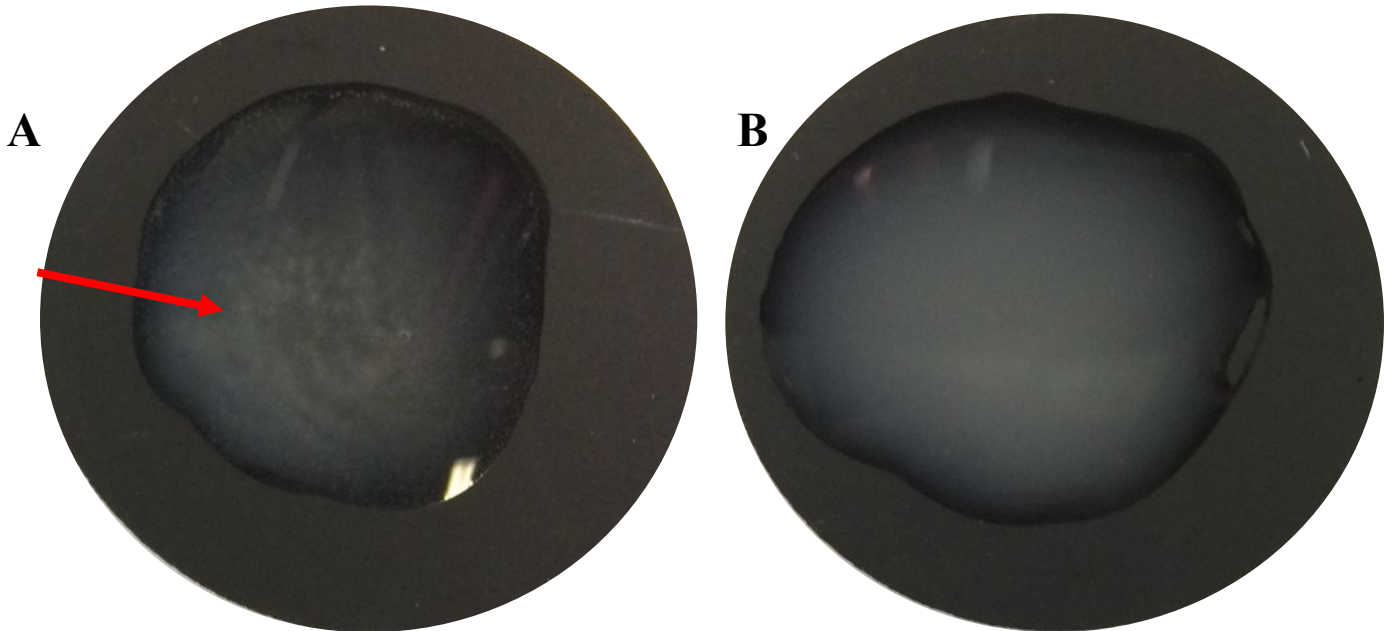
### **5.8 Estabelecer o protocolo de execução do ensaio de aglutinação e avaliação da sensibilidade, especificidade, reatividade cruzada e efeito prozona do ensaio de aglutinação**

#### **5.8.1.1 Método de detecção de veneno de *C.d. terrificus***

Nestes estudos, inicialmente foram conduzidos ensaios com partículas de 800 nm e 600 nm. O percentual de revestimento de ambas as partículas foi de 20% com anti-*C.d. terrificus*. Ao observar a suspensão de MP de 800 nm, percebeu-se que esta possuía aspecto arenoso e rugoso (Figura 36A). Devido ao “background” grosseiro da suspensão, leituras realizadas aos

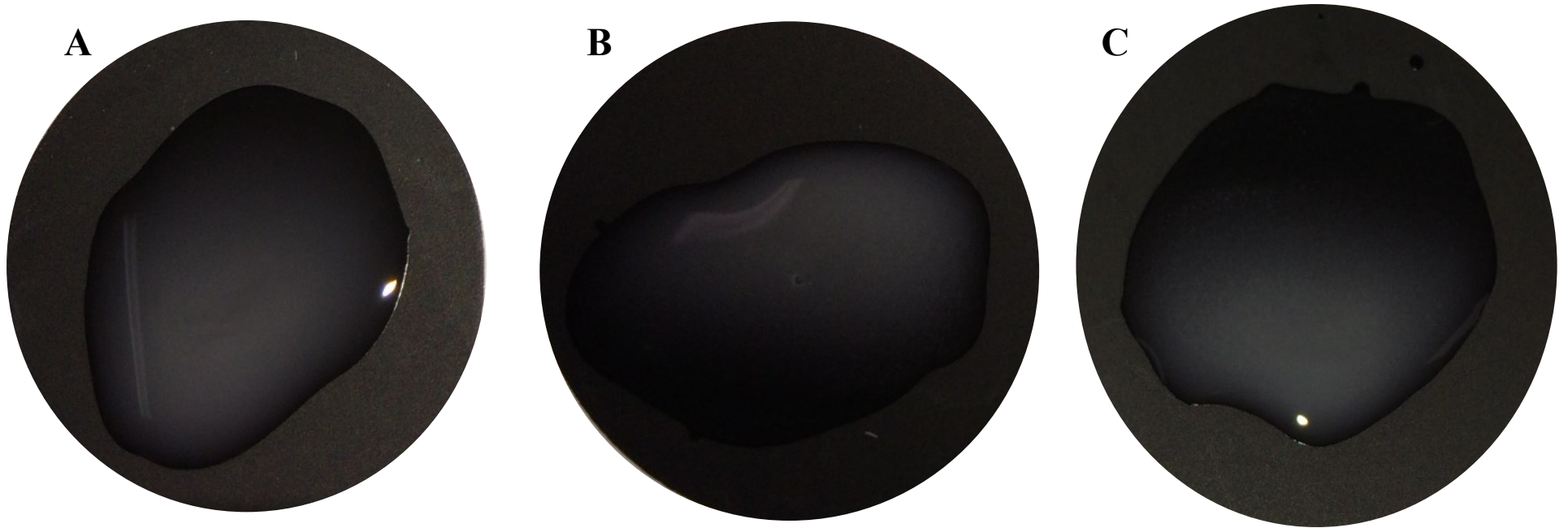
5 minutos, não permitiam a diferenciação de amostras de soro contendo veneno nas concentrações de 16, 31 e 62 ng/mL de uma amostra negativa.

**Figura 36 - Suspensão de micropartículas de 800 nm (A) e 600 nm (B) revestidas com 20% de anti-*C.d. terrificus*.**



A suspensão de MP de 600 nm apresentou aspecto mais homogêneo (Figura 36B), porém, ao avaliar amostras de veneno de *C.d. terrificus* nas concentrações de 16, 31 e 62 ng/mL (Figura 37) nenhuma aglutinação foi visualizada.

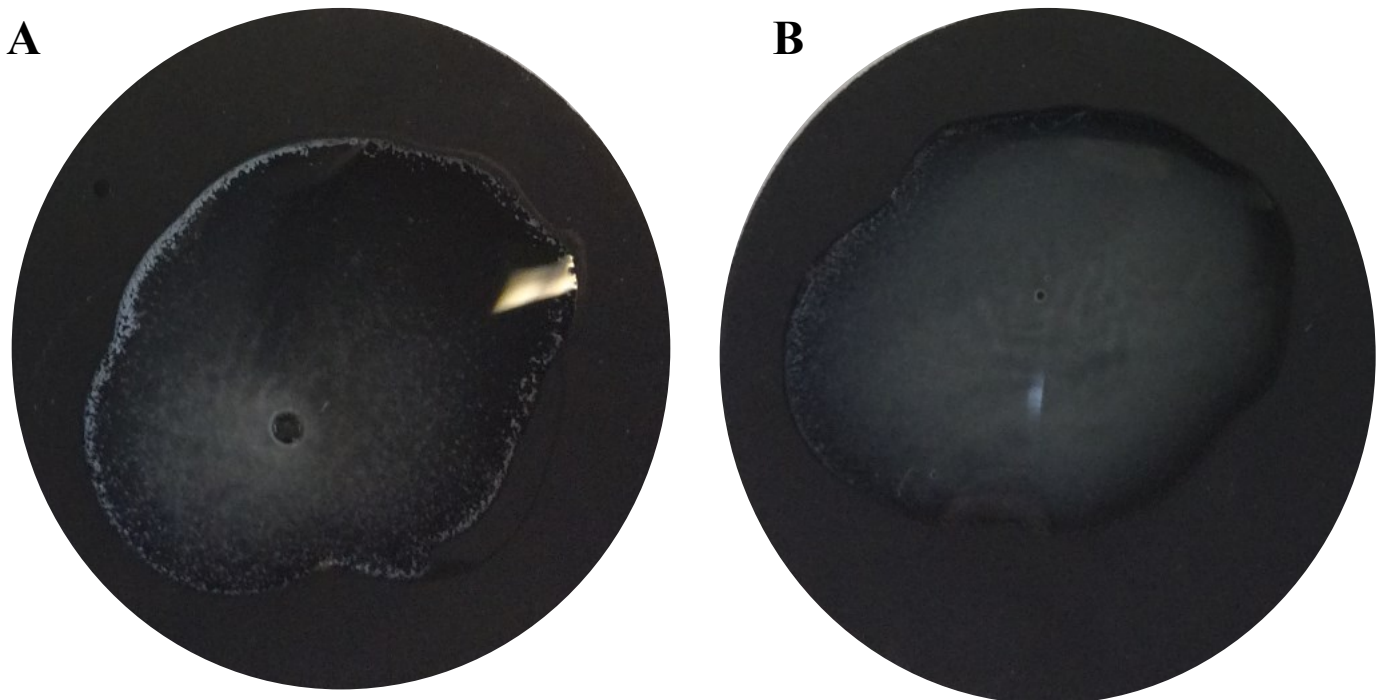
Figura 37 - Ausência de aglutinação na suspensão de 600 nm avaliadas com amostras de veneno de *C.d. terrificus* nas concentrações de 16(A), 31(B) e 62(C) ng/mL.



A ausência de aglutinação é um indício de que a quantidade de anticorpos na superfície das micropartículas está insuficiente para estabelecer a formação dos agregados, que ocorre devido a interação dos anticorpos presentes nas partículas e os antígenos da amostra. Para tanto, aumentou-se o percentual de revestimento de 20% para 50% das partículas de látex de 800 nm e 600 nm, buscando-se elevar a sensibilidade.

No entanto, o aumento do percentual de revestimento das partículas intensificou a formação de aglutinação inespecífica para ambos os tamanhos de MP inviabilizando sua utilização em ensaios de detecção de veneno (Figura 38).

**Figura 38 - Aglutinação inespecífica das partículas de 800 nm (A) e de 600 nm (B) com revestimento de 50% de sua superfície com anti-*C.d. terrificus*.**



Uma variedade de fatores é citada como possíveis causas da aglutinação inespecífica. Dentre estes estão os fluídos corporais, utilizado como amostras, que contêm substâncias indefinidas, além do analito de interesse específico, que podem causar ou inibir a aglutinação (138).

Invariavelmente, a aglutinação inespecífica pode ocorrer por um mecanismo de ponte (“bridging”). Este mecanismo assume que a biomolécula ligada à partícula, tem cadeias ou voltas (“loops”) que se estendem suficientemente distante para o meio, encontrando outra partícula. Conseqüentemente, isto provoca a ligação inespecífica entre duas partículas. A aglutinação por



este fenômeno é importante em baixos graus de cobertura e pode ser eliminado usando uma proteína não reativa para cobrir a superfície livre de partículas revestidas com anticorpos.

A agregação inespecífica acontece também após o procedimento de revestimento com as proteínas, com as partículas de látex exibindo baixa estabilidade coloidal e a aglutinação ocorrendo em valores de pH e força iônica que reproduzem parâmetros fisiológicos (138). Partículas maiores exibem uma tendência maior de sedimentação, conseqüentemente, possuem menor estabilidade coloidal.

Diante dos resultados alcançados e das possíveis causas de aglutinação inespecífica, decidiu-se avaliar MP de 400 nm e avaliar a cobertura por co-acoplamento. Para o co-acoplamento selecionou-se uma proteína não relacionada de peso molecular conhecido. Para identificar qual a melhor condição de sensibilização das partículas, uma varredura de percentuais foi realizada desde 100% de cobertura com anti-*C.d. terrificus* até uma associação entre de 20% anti-*C.d. terrificus* com 80% de proteína não relacionada.

As partículas revestidas completamente com anti-*C.d. terrificus* induziram uma reatividade inespecífica com amostras negativas, e as revestidas com 20% de anti-*C.d. terrificus* perderam a habilidade de aglutinação, até mesmo quando avaliada com amostra contendo 500 ng/mL de veneno.

A triagem revelou que a melhor condição alcançada foi com 40% de anti-*C.d. terrificus* e 60% de proteína não relacionada. Sendo assim, amostras de soro com concentração de 1000 ng/mL até 0 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus* foram ensaiadas, numa proporção 1:1 de amostra: partículas e inspeção visual realizada aos 6 minutos (Figura 39).

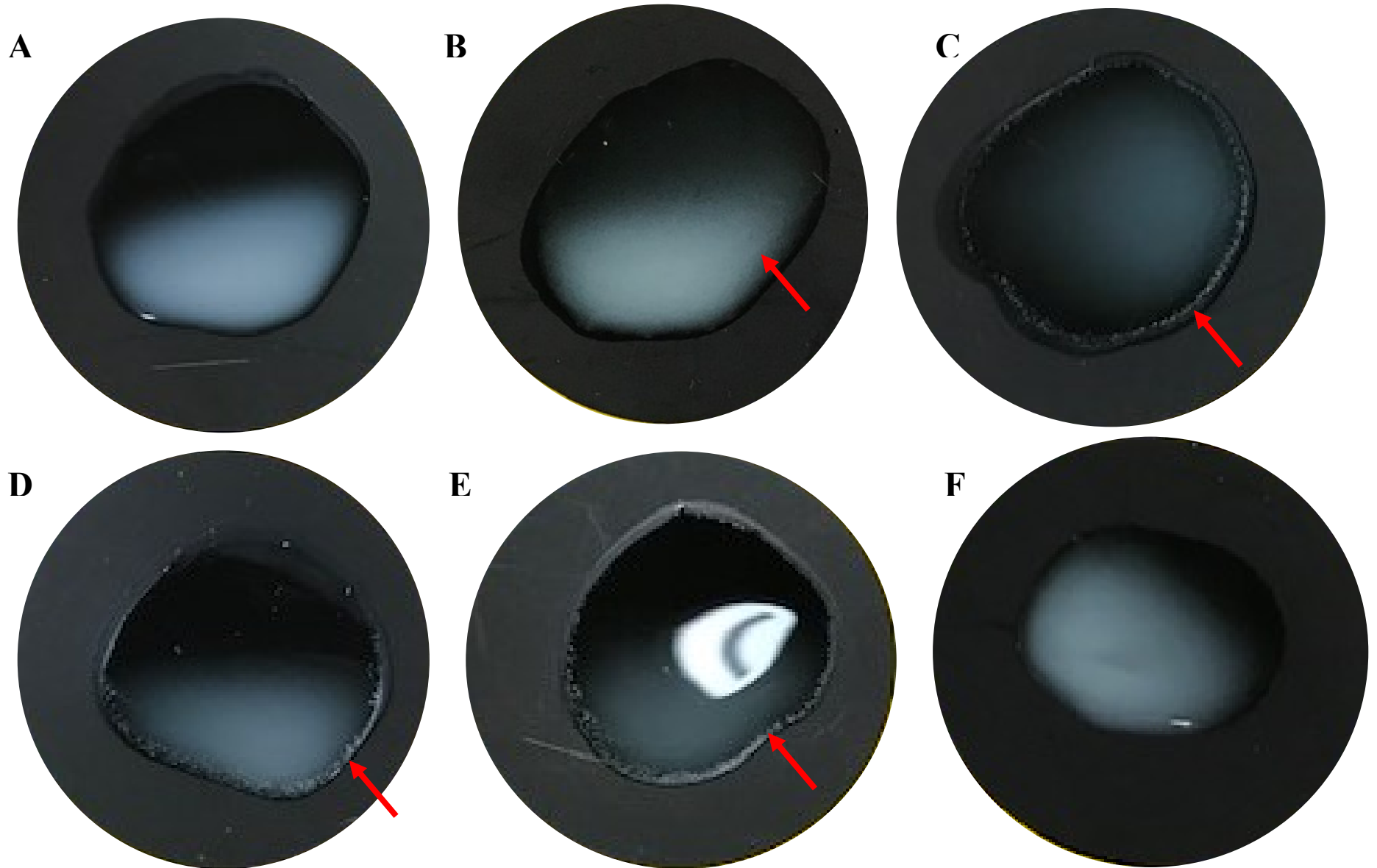
Com a amostra de 62 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus* é possível observar traços de aglutinação, mudando o padrão da suspensão de lisa e homogênea, quando ensaiada com amostra negativa (Figura 39A) para rugosa (Figura 39B). Já na concentração de 250 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus* (Figura 39C) há formação de finos agregados brancos nas bordas que aumentam de tamanho quando ensaiado com amostra contendo veneno nas concentrações de 500 ng/mL (Figura 39D) e 1000 ng/mL (Figura 39E). A avaliação de soros de pacientes que sofreram acidentes ofídicos envolvendo *C. durissus* indicaram níveis circulantes de veneno entre 102 a 1569 ng/mL (64). A amostra de 274 ng/mL de *B. jararaca* não foi capaz de causar a formação de agregados visíveis apesar de ter causada uma discreta na rugosidade da suspensão (Figura 39F).

A concentração de 274 ng/mL de veneno de *B. jararaca* foi selecionada devido a aglutinação com o 250 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus* ter sido intensa. Tal valor de veneno

de *B. jararaca* também está próximo do limite superior reportado em pacientes hospitalizados que é de 300 ng/mL, enquanto o limite inferior é 85 ng/mL (64).

A menor concentração de veneno de *C.d. terrificus* avaliada foi 8 ng/mL resultando em ausência de aglutinação assim como a de 16 e 31 ng/mL. Desse modo, consideramos que a sensibilidade do método é 62 ng/mL, e que não há ocorrência de efeito prozona até 1000 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus*.

**Figura 39 - Aglutinação da suspensão de partículas de 400 nm frente as amostras contendo veneno de *C.d. terrificus* e *B. jararaca*. A suspensão de partículas foi avaliada numa proporção 1:1 com amostras contendo (A) 0 ng/mL; (B) 62 ng/mL; (C) 250 ng/mL; (D) 500 ng/mL, (E) 1000 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus* e (F) 274 ng/mL de veneno de *B. jararaca*.**



Como a aglutinação inespecífica é uma das principais causas de insucesso deste método (138) conduziu-se a avaliação de diversas amostras negativas.

**Tabela 13 - Avaliação da inespecificidade da suspensão de partículas de 400 nm revestidas com anti-*C.d. terrificus*.**

Identificação da amostra	Veneno	Concentração de veneno (ng/mL)	Resultado
1	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
2	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
3	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
4	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
5	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
6	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
7	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
8	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
9	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
10	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
11	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
12	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
13	<i>C.d. terrificus</i>	0	Positivo
14	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
15	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
16	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
17	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
18	<i>C.d. terrificus</i>	0	Negativo
19	<i>C.d. terrificus</i>	8	Negativo
20	<i>C.d. terrificus</i>	16	Negativo
21	<i>C.d. terrificus</i>	31	Negativo

Dentre as 18 amostras de soro sabidamente negativas, uma apresentou reação de agregação inespecífica, e, portanto, pode estar relacionada com a natureza da amostra.

Para eliminar o fator reumatoide, anticorpo comum na artrite reumatoide (139) e conhecido interferente em ensaios com partículas de látex (140), conduziu-se a determinação deste anticorpo na amostra 13. A concentração determinada foi próxima de 0 UI/mL, permitindo excluir este interferente como responsável pela inespecificidade.

Apesar de não ter sido identificada a causa da aglutinação com a amostra 13, considera-se que a suspensão de 400 nm possui baixa inespecificidade e ausência de reatividade com veneno de *B. jararaca* até 274 ng/mL.

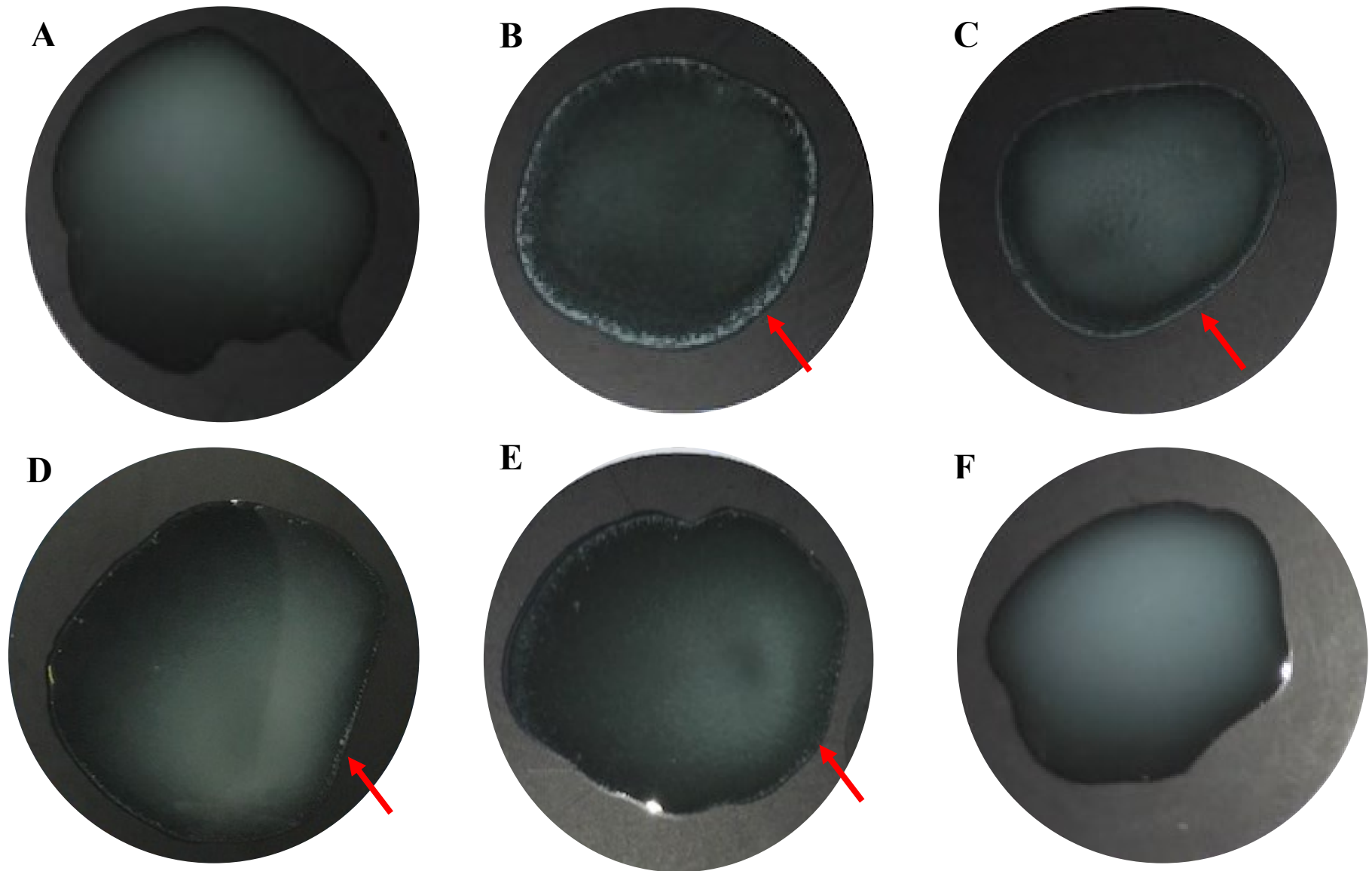
Contudo, é necessário avançar no aprimoramento da suspensão a fim de eliminar a possibilidade de falso negativo de amostras ausentes de veneno, de otimizar a sensibilidade frente ao veneno de *C.d. terrificus*, de ampliar o estudo com amostras de outras espécies epidemiologicamente relevantes, e de reduzir o background observado para amostras contendo elevada concentração de veneno de *B. jararaca*.

#### **5.8.1.2 Método de detecção de veneno de *B. jararaca***

A partir do racional estabelecido no desenvolvimento de método de detecção de veneno de *C.d. terrificus*, o mesmo foi executado para se detectar veneno de *B. jararaca*. Posto isto, o tamanho da partícula selecionado é o de 400 nm, a ligação dos anticorpos será por adsorção num modelo de co-acoplamento, mas o anticorpo utilizado será o anti-*Bothrops*.

A triagem do percentual de revestimento foi executada variando-se desde 100% de revestimento somente com anti-*Bothrops* até 20% de anti- *Bothrops* associado com 80% de proteína não relacionada. Esta última, foi a condição onde a formação de agregados foi favorecida. Sendo assim, amostras de soro com concentração de 2000 ng/mL até 2,74 ng/mL de veneno de *B. jararaca*, de 1000 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus* (Figura 40).e de *Micrurus frontalis* de 31 e 250 ng/mL (Tabela 14) e amostras negativas foram ensaiadas, numa proporção 1:1 de amostra: partículas e inspeção visual realizada aos 6 minutos.

**Figura 40 - Aglutinação da suspensão de partículas de 400 nm frente as amostras contendo veneno de *B. jararaca* e *C.d. terrificus*. A suspensão de partículas foi avaliada numa proporção 1:1 com amostras contendo (A) 0 ng/mL; (B) 2,74ng/mL; (C) 274 ng/mL; (D) 500 ng/mL, (E) 1500 ng/mL de veneno de *B. jararaca* e (F) 1000 ng/mL de veneno de *C.d. terrificus*.**



A concentração de 2,74 ng/mL de veneno de *B. jararaca* produziu intensa e rápida formação de agregados grosseiros, identificados principalmente nas bordas (Figura 40B). A presença de aglutinados mais finos também pode ser visualizada na amostra 274 ng/mL de veneno de *B. jararaca* (Figura 40C). A intensidade da agregação tende a reduzir à medida que se aumenta a concentração do veneno, até um ponto em que traços de aglutinados são vistos nas bordas (Figura 40D) e a aparência da suspensão no meio é rugosa (Figura 40E) em comparação com o aspecto homogêneo e lisa da amostra negativa (Figura 40A).

O comportamento de intensa aglutinação em concentrações reduzidas de antígeno pode ser explicado pela reduzida quantidade de anti-*Bothrops* utilizada na cobertura das partículas (20%), alcançando-se rapidamente a zona de equivalência onde grande complexos imunes são formados. Esta característica pode elevar a ocorrência de falso negativos, devido a inibição da agregação por excesso de antígenos (141), que nesta condição poderia ser em alta concentração de veneno de *B. jararaca*. Porém, não foi observado efeito prozona até 1500 ng/mL, concentração elevada considerando níveis circulantes de veneno em pacientes hospitalizados (64).

Todas as amostras que não continham veneno de *B. jararaca* foram negativas para sua presença assim como as amostras contendo veneno de *Micrurus frontalis* (Tabela 14).

**Tabela 14 - Avaliação da inespecificidade da suspensão de partículas de 400 nm revestidas com anti-*Bothrops*.**

Identificação da amostra	Veneno	Concentração de veneno (ng/mL)	Resultado
1	<i>B. jararaca</i>	0	Negativo
2	<i>B. jararaca</i>	0	Negativo
3	<i>B. jararaca</i>	0	Negativo
4	<i>M. frontalis</i>	31	Negativo
5	<i>M. frontalis</i>	250	Negativo

Posto que, as partículas não apresentaram aglutinação inespecífica, considera-se que é necessário ampliar o espectro de avaliação de amostras negativas, de amostras positivas para a presença de veneno de outras espécies do gênero *Bothrops*, bem como variadas concentrações de veneno de *C.d. terrificus*. Também se faz preciso, ajustar o percentual das partículas ou de seu revestimento para que a intensidade de aglutinação seja mais proeminente em concentrações mais elevadas de veneno de *B. jararaca*.



## 6 DISCUSSÃO

Segundo a OMS, os acidentes ofídicos são considerados uma doença tropical negligenciada, com aproximadamente 2,7 milhões de envenenamentos e 138000 mortes por ano ao redor do mundo, afetando principalmente trabalhadores rurais e crianças (142). No Brasil, 95 % dos acidentes ofídicos envolvem espécies do gênero *Bothrops* e *C.d. terrificus* (9).

O ofidismo, apesar de números alarmantes, apresenta diversas condições que precisam ser superadas. No que tange ao diagnóstico, primeiro fator que afeta a população é o acesso aos serviços de saúde, pois os acometidos pelo acidente ofídico geralmente se encontram distantes dos centros urbanos. Aliado a isso, há a dificuldade de se realizar um correto diagnóstico clínico devido a sobreposição de sintomas. No território nacional, manifestações clínicas dos acidentes botrópicos e crotálicos podem apresentar sintomas similares, como parestesia, edema, alterações no tempo de coagulação, oligúria, anúria e hemoglobina e/ou mioglobina na urina (17), o que dificulta a conduta médica em relação ao tratamento específico com soro antiofídico (18).

No que se refere ao diagnóstico laboratorial, não há opções disponíveis comercialmente onde ocorre a biodeteção do veneno no sangue das vítimas. Alternativamente, utiliza-se ferramentas que se baseiam na detecção de alterações nos parâmetros sanguíneos como prolongamento ou redução dos tempos de coagulação, plaquetopenia, alterações nas contagens de hemácias e leucócitos, presença/ausência de mioglobinúria, alterações enzimáticas (elevação de creatino quinase). Porém, sua utilidade apenas terá validade se o médico conseguir associar as alterações bioquímicas, aos sintomas e ao agente causador, conseguindo desta forma direcionar o correto tratamento (143).

O único tratamento específico é o soro antiofídico, mas para ter sucesso é necessário administrar o antiveno correto e em tempo hábil. No Brasil, apenas 4 centros produzem estes soros terapêuticos. O modelo de produção envolve a imunização de cavalos com o veneno bruto. Após a coleta de sangue, o plasma equino é tratado para se remover grande parte das proteínas, permanecendo apenas as imunoglobulinas que compõem o antídoto. No entanto, a maioria dos antivenenos possuem uma grande porção de imunoglobulinas que não são direcionadas contra os componentes do veneno (aproximadamente 70%) (93), que por sua vez acabam por induzir reações de hipersensibilidade.

Apesar de sua especificidade como tratamento, os antivenenos disponíveis podem às vezes não proteger satisfatoriamente os pacientes, devido ao fato de o antiveneno produzido

não possuir anticorpos que reconhecem um componente tóxico específico presente no veneno da serpente ofensiva (43) (89).

Diante deste cenário, estes estudos foram conduzidos a fim de auxiliar na superação das lacunas identificadas como: a necessidade de se ter métodos acessíveis de diagnósticos “*in vitro*” por biodeteção e o aprimoramento na produção de antivenenos.

A primeira etapa do estudo foi a obtenção de anticorpos específicos anticrotálicos e antibotrópicos, que permitam sua utilização para biodetectar corretamente estes venenos em amostras de sangue e sua utilização no mapeamento de toxinas específicas.

Para tanto, passos de precipitação de IgG de plasma de cavalos imunizados com veneno de *C.d. terrificus* ou *Bothrops spp* foram executados. Posteriormente, as IgG's foram submetidas a imunopurificação por afinidade. Duas colunas foram montadas uma com veneno de *C.d. terrificus* e outra contendo venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

Os anticorpos imunopurificados anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* foram avaliadas por ELISA indireto, quanto a sua capacidade de reconhecimento aos venenos que lhes deram origem, ao que ficou demonstrado que eram semelhantes em relação às IgG's que não haviam sido imunopurificadas (Figura 8 e 10). A redução da reatividade cruzada entre anti-*C.d. terrificus* e veneno de serpentes *Bothrops spp* (Figura 9), e entre anti-*Bothrops* e veneno de *C.d. terrificus* (Figura 11) também foi demonstrada.

Posto que, as imunopurificações reduziram a reatividade cruzada de ambos os anticorpos sem comprometer sua capacidade de reconhecimento, anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* foram utilizados para mapear epitopos lineares das principais toxinas dos venenos que lhes deram origem.

Os principais epitopos lineares identificados com anti-*C.d. terrificus* foram da Crotamina código Uniprot Q9PWF3 e Fosfolipase A2 crotóxina subunidade básica CB código Uniprot P623022, que correspondem aos dois componentes mais abundantes no veneno de *C.d. terrificus* (13).

A análise “*in silico*” dos spots reativos de crotamina mostrou que os resíduos 34–54 estão expostos na superfície do modelo tridimensional dessa toxina (Figura 13), consistente com o reconhecimento antigênico pelos anticorpos anticrotálicos. Assim, esta sequência deu origem ao peptídeo sintético Crotam1.

Três epitopos foram identificados na PLA2 utilizando o anti-*C.d. terrificus*, e estão em acordo com os descritos anteriormente em estudos de cristalografia, no qual os locais mais prováveis relacionados à atividade neurotóxica estão situados nas regiões n e c-terminais, alças

de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  e folhas  $\beta$ , expostos na superfície do tetrâmero e seus dímeros (28) (Figura 16).

O epitopo localizado na porção n-terminal foi sintetizado na forma solúvel e nomeado Ctx2, o situado no meio da toxina e contendo resíduos relacionados com a coordenação do íon cálcio é o Ctx3 e por último a região mais intensamente reconhecida pelos anti-*C.d. terrificus*, dispostos na porção c-terminal está o epitopo Ctx4.

As toxinas Giroxina código Uniprot Q58G94 e vNGF código Uniprot Q9DEZ9 tiveram vários spots mapeados, porém a intensidade do reconhecimento com anti-*C.d. terrificus* (respectivamente, Figuras 18B e 20B) foi muito menor em comparação com a do plasma anticrotálico (respectivamente, Figuras 18C e 20C). O alinhamento de ambas as toxinas (Figuras 19 e 21) com as respectivas proteínas de *B. jararaca* indicou similaridade entre si e na sequência dos epitopos identificados, podendo ser a etapa de purificação responsável pela redução da resposta com o anti-*C.d. terrificus*.

No mapeamento das toxinas de *B. jararaca* apenas Zinco metaloprotease código Uniprot O93523, SNACLEC botrocetina beta código Uniprot P22030 e PLA2 código Uniprot P81243 se mostraram reativas frente ao anti-*Bothrops* e IgG antibotrópica, sugerindo que os epitopos de demais toxinas avaliadas, Serino protease (SVSP) código Uniprot Q9PTU8; SNACLEC botrocetina subunidade alfa código Uniprot P22029 e Peptídeo natriurético e potencializador de bradicinina código Uniprot Q6LEM5 possam ser conformacionais.

As sequências mapeadas (Tabela 10) devem ser alvo de adicionais investigações para esclarecer seu potencial como epitopos indutores de antipeptídeos neutralizantes, uma vez que estudo publicado sobre a botropasina (95), demonstrou inibição de atividade hemorrágica de antipeptídeos produzidos contra o epitopo  $\text{K}^{222}\text{ARMYELANIVNEILRYL}^{239}$ , também identificados neste trabalho.

Devido a relevância da crotamina e crotoxina no quadro do envenenamento crotálico, os peptídeos solúveis Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4 (Figuras 29 a 32) foram utilizados como antígenos. Os antipeptídeos produzidos em coelhos, por meio de ciclos de imunizações de lipossomas contendo uma mistura dos quatro peptídeos, foram avaliados quanto a sua capacidade ligação ao veneno de *C.d. terrificus*, crotamina, crotoxina, Crotam1, Ctx2, Ctx3 e Ctx4.

Os antipeptídeos não foram hábeis em reconhecer tanto a crotamina quanto ao peptídeo Crotam1, (Figuras 33 e 34) indicando baixo potencial imunogênico deste peptídeo em induzir a formação de anticorpos anti-Crotam 1, ou que este, não possuía conformação adequada no momento de sua apresentação às células B.

A identificação da crotoxina e dos peptídeos Ctx2, Ctx3 e Ctx 4 pelos anti-peptídeos, caracteriza tais epitopos como imunocompetentes na produção de anticorpos específicos (Figuras 33 e 34). As maiores repostas foram constatadas para a ligação ao Ctx2 e Ctx4 (Figura 34), que na toxina estão localizados espacialmente no n- e c-terminal, respectivamente (Figura 16).

A ligação dos anti-peptídeos ao veneno foi semelhante ou até maior que o reconhecimento pelos anti-*C.d. terrificus* (Figura 33), demonstrando a habilidade dos anti-peptídeos reconhecerem o epitopo na toxina, e não só como fragmento peptídico.

A ação neutralizante dos anti-peptídeos sob a letalidade do veneno de *C.d. terrificus* foi então avaliada após a determinação da DL50 (Figura 35). Os anti-peptídeos produzidos em três animais foram avaliados individualmente por diluição 1:2 e 1:4, seguido de adição de 7 DL50 (14 µg) de veneno de *C.d. terrificus*. A taxa de sobrevivência resultante, respectivamente nas diluições 1:4 e 1:2, foi de 8% e 42% com anti-peptídeos do coelho 1; 33% e 50% do coelho 2 e 16% e 50% do coelho 3. A taxa de sobrevivência ao se adicionar a mesma dose de veneno ao soro do animal controle foi de 0%. (Tabela 12).

Desse modo, demonstrou-se que o mapeamento com anti-*C.d. terrificus* de uma diversidade de epitopos da crotoxina, e a produção de anti-peptídeos específicos a partir deles, apresentaram habilidade em neutralizar a ação letal do veneno de *C.d. terrificus*. Assim, os peptídeos sintéticos podem contribuir para a produção de antivenenos mais eficientes, aliados a redução da dependência da utilização do veneno bruto e uma potencial alternativa atóxica para os animais imunizados.

Visto que, os anticorpos imunopurificados anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* possuíam reduzida reatividade cruzada entre os venenos de serpentes *Bothrops spp* e *C.d. terrificus*, respectivamente, sem comprometer o reconhecimento do veneno utilizado como imunógeno, tais anticorpos foram utilizados como matéria-prima no desenvolvimento de um método de diagnóstico “*in vitro*” para biodeteção de veneno de *C.d. terrificus* ou de serpentes *Bothrops spp*.

O método de aglutinação foi selecionado por ser considerado uma técnica de diagnóstico “*in vitro*” sensível, rápida, de simples execução, que requer estrutura e capacitação técnica mínimas, passos de incubação otimizados em temperatura ambiente e discriminação visual das densidades óticas entre a amostra e o controle (65). Dessa forma, pode fornecer aos médicos, em hospitais rurais ou urbanos, meios que permitam a detecção precoce do envenenamento e identificação das espécies causadoras das mordidas.

Para tanto, o primeiro passo racional de desenvolvimento foi a seleção do tamanho e da natureza das partículas. Uma vez selecionado as partículas de 400 nm, o revestimento das microesferas foi realizado em modelo de co-acoplamento com anticorpo específico e proteína não relacionada, por adsorção passiva.

Na sequência, as micropartículas revestidas com anti-*C.d. terrificus* foram avaliadas com amostras de variadas concentrações de veneno de *C.d. terrificus*. Nesta condição, a menor concentração de veneno detectada foi 62 ng/mL (Figura 39B) e não houve ocorrência de efeito prozona até 1000 ng/mL (Figura 39E). A ausência de reatividade cruzada foi determinada até a concentração de 274 ng/mL (Figura 39F) de veneno de *B. jararaca*. A aglutinação inespecífica foi investigada utilizando-se 18 amostras negativas, destas, apenas 1 amostra induziu tal resposta. Uma possível causa de agregação inespecífica é a presença de fator reumatóide, porém a dosagem indicou 0 UI/mL na amostra e, portanto, não foi possível esclarecer a causa do falso-positivo.

Para as micropartículas revestidas com anti-*Bothrops*, a menor concentração de veneno de *B. jararaca* detectada foi de 2,74 ng/mL (Figura 40B) e não houve efeito prozona até 1500 ng/mL (Figura 40E). Não houve ocorrência de reatividade cruzada com veneno de *C.d. terrificus* até a concentração de 1000 ng/mL (Figura 40F) e *M. frontalis* até a concentração de 250 ng/mL. A inespecificidade também foi avaliada com amostras negativas das quais não houve nenhuma aglutinação.

Sendo assim foi possível demonstrar a viabilidade do método de aglutinação, no qual as microesferas foram revestidas com anticorpos purificados, na detecção do veneno de *C.d. terrificus* e *B. jararaca*. Estudos de reatividade cruzada e aglutinação inespecífica devem ser ampliados para garantir o desempenho do método.

Portanto, conclui-se os estudos, considerando que a produção de antivenenos a partir de epitopos estrategicamente selecionados, de toxinas relevantes para o quadro de envenenamento ofídico, pode ser uma medida alternativa para aprimorar a qualidade dos soros antiofídicos, pois demonstrou-se a eficácia dos antipeptídeos em neutralizar a letalidade do veneno de *C.d. terrificus*. Além disso, a utilização dos anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops* como matéria-prima no revestimento de micropartículas de tamanho apropriado tornam viáveis o desenvolvimento de método de aglutinação para diagnóstico “*in vitro*” do veneno de *C.d. terrificus* e do gênero *Bothrops*.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a associação de precipitação de imunoglobulinas com sulfato de amônio e, purificação por cromatografia por imunoafinidade viabilizaram a obtenção de anticorpos imunopurificados. O anti-*C.d. terrificus* e o anti-*Bothrops* reconheceram os respectivos venenos que lhes deram origem com reduzida reatividade cruzada respectivamente, contra o veneno de *Bothrops* e de *C.d. terrificus*.

Além disso, a utilização dos anticorpos imunopurificados, como ferramenta biotecnológica, permitiu identificar por Spot synthesis epitopos lineares de crotamina e crotoxina do veneno *C.d. terrificus* quando se utilizou o anti-*C.d. terrificus*. Epitopos lineares de metaloprotease, PLA2 e SNACLEC botrocetina subunidade beta do veneno de *B. jararaca* foram identificados quando se utilizou o anti-*Bothrops*.

A partir da sequência de resíduos dos epitopos lineares mapeados de crotamina e crotoxina foi realizada a síntese de peptídeos Crotam I de crotamina e Ctx2, Ctx3 e Ctx4 de crotoxina. Todos os peptídeos foram utilizados na imunização de coelhos, no entanto, apenas Ctx2, Ctx3 e Ctx4 apresentaram capacidade imunogênica.

Os antipeptídeos foram ensaiados por ELISA e demonstraram reconhecer o veneno de *C. d. terrificus*, crotoxina e os peptídeos Ctx2, Ctx3 e Ctx4. Além disso, os antipeptídeos em ensaios de neutralização apresentaram habilidade em reduzir a letalidade do veneno de *C. d. terrificus*.

Os anticorpos imunopurificados, anti-*C.d. terrificus* e anti-*Bothrops*, também foram utilizados no desenvolvimento de um método de aglutinação para diagnóstico diferencial “*in vitro*”, respectivamente dos venenos de *Bothrops* spp. e de *C.d. terrificus*.

As partículas de poliestireno revestidas com anti-*C.d. terrificus* detectaram o veneno de *C.d. terrificus* em soro, e não apresentaram reatividade cruzada com o de *B. jararaca*. Enquanto que as partículas revestidas com anti-*Bothrops*, detectaram veneno de *B. jararaca* em soro, e não apresentaram reatividade cruzada com veneno de *C.d. terrificus*.

Desse modo, é possível concluir que o método de aglutinação detectou de maneira rápida, específica e sensível venenos de *C.d. terrificus* e *B. jararaca*.

## 8 REFERENCIAS

1. Chippaux JP. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! Vol. 23, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2017.
2. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. Vol. 72, *Journal of Proteomics*. 2009. p. 165–82.
3. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:17063. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201763>.
4. Mohapatra B, Warrell DA, Suraweera W, Bhatia P, Dhingra N, Jotkar RM, et al. Snakebite mortality in India: A nationally representative mortality survey. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4).
5. Chippaux JP. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: A meta-analytic approach. *Toxicon*. 2011;57(4):586–99.
6. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Lalloo DG. Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(12).
7. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. Vol. 76, *Bulletin of the World Health Organization*. 1998. p. 515–24.
8. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 2008;5:e218.
9. Ministério da Saúde B. Dados epidemiológicos: Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil [Internet]. [cited 2018 Jan 4]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.
10. Brasil M da S. TabNet Win32 3.0: Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil [Internet]. [cited 2018 Mar 14]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.
11. Warrell DA. Snake bite. Vol. 375, *The Lancet*. 2010. p. 77–88.
12. Fry BG, Casewell NR, Wüster W, Vidal N, Young B, Jackson TNW. The structural and functional diversification of the *Toxicofera* reptile venom system. *Toxicon*. 2012;60(4):434–48.
13. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, De La Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, et al. Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J Proteome Res*. 2010;9(1):528–44.

14. Gonçalves-Machado L, Pla D, Sanz L, Jorge RJB, Leitão-De-Araújo M, Alves MLM, et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. *J Proteomics*. 2016;135:73–89.
15. Damico DCS, Lilla S, De Nucci G, Ponce-Soto LA, Winck F V., Novello JC, et al. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2005;1726(1):75–86.
16. Brasil, Saúde M da, Saúde S de V em, Serviços C-G de D da E em. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Ministério da Saúde 2017.
17. Amaral CF, de Rezende NA, da Silva OA, Ribeiro MM, Magalhães RA, dos Reis RJ, et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986;28(4):220–7.
18. Rádis-Baptista G, Moreno FBMB, Nogueira LDL, Martins AMC, Toyama DDO, Toyama MH, et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. In: *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2006. p. 412–23.
19. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Vol. 36, *Toxicon*. 1998. p. 823–46.
20. Parkinson CL, Campbell JA, Chippindale PT. Multigene phylogenetic analysis of pitvipers, with comments on their biogeography. *Biol Vipers*. 2002;(July 2014):93–110.
21. Shine R. Snakes. The evolution of mystery in nature - Greene, HW. *Science* (80- ). 1997;277:1945–6.
22. Wüster W, Ferguson JE, Quijada-Mascareñas JA, Pook CE, Salomão MDG, Thorpe RS. Tracing an invasion: Landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol Ecol*. 2005;14(4):1095–108.
23. Fundação Ezequiel Dias F. Animais Peçonhentos [Internet]. [cited 2018 Mar 15]. Available from: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2010/03/cartilha.pdf>.
24. University of Florida. Compare Rattlesnake Rattles :: Florida Museum of Natural History [Internet]. [cited 2018 Mar 26]. Available from: <https://www.floridamuseum.ufl.edu/herpetology/fl-snakes/compare7>.
25. Kattah LR, Ferraz V, Matos Santoro M, Ribeiro Da Silva Camargos E, Ribeiro Diniz C, De Lima ME. Analysis of fatty acids released by crotoxin in rat brain synaptosomes. *Toxicon*. 2002.
26. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom



- phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. Vol. 65, Cellular and Molecular Life Sciences. 2008. p. 2897–912.
27. BON C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A2. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism,. In: Kini, RM, editors. Wiley Chichester. 1997. 269–285 p.
  28. Marchi-Salvador DP, Corrêa LC, Magro AJ, Oliveira CZ, Soares AM, Fontes MRM. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *C.d. terrificus* venom. Proteins Struct Funct Bioinforma [Internet]. 2008 Feb 14 [cited 2018 Jan 10];72(3):883–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.21980>.
  29. Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. J Mol Biol. 2011;412(2):176–91.
  30. Coronado MA, Georgieva D, Buck F, Gabdoulkhakov AH, Ullah A, Spencer PJ, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotoamine, a myotoxic polypeptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012;68(9):1052–4.
  31. Coronado MA, Gabdulkhakov A, Georgieva D, Sankaran B, Murakami MT, Arni RK, et al. Structure of the polypeptide crotoamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr. 2013;69(10):1958–64.
  32. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest. 1985;76(4):1427–35.
  33. Chang CC, Tseng KH. Effect of crotoamine, a toxin of south american rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. Br J Pharmacol. 1978;63(3):551–9.
  34. Mancin AC, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Faça VM, Greene LJ, Zuccolotto S, et al. The analgesic activity of crotoamine, a neurotoxin from *C.d. terrificus* (South American rattlesnake) venom: A biochemical and pharmacological study. Toxicon. 1998;36(12):1927–37.
  35. Yonamine CM, Prieto-da-Silva ARB, Magalhães GS, Rádis-Baptista G, Morganti L, Ambiel FC, et al. Cloning of serine protease cDNAs from *C.d. terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. Toxicon. 2009;54(2):110–20.
  36. Kozako T, Kawachi A, Cheng S Bin, Kuchiiwa S, Motoya T, Nakagawa S, et al. Role of the vestibular nuclei in endothelin-1-induced barrel rotation in rats. Eur J Pharmacol. 2002;454(2–3):199–207.
  37. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Brazilian J Med Biol Res. 1986;19(3):333–8.
  38. Kostiza T, Dahinden CA, Rihs S, Otten U, Meier J. Nerve growth factor from the

- venom of the chinese cobra *Naja naja atra*: Purification and description of non-neuronal activities. *Toxicon*. 1995;33(10):1249–61.
39. Kostiza T, Meier J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon*. 1996;34(7):787–806.
  40. Rádis-Baptista G, Moreno FBMB, de Lima Nogueira L, Martins AMC, de Oliveira Toyama D, Toyama MH, et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochem Biophys* [Internet]. 2006 [cited 2018 Jan 10];44(3):412–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679528>.
  41. Drickamer K. C-type lectin-like domains. Vol. 9, *Current Opinion in Structural Biology*. 1999. p. 585–90.
  42. Fry BG, Wüster W. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Mol Biol Evol*. 2004;21(5):870–83.
  43. Ministério da Saúde, da Saúde M. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2001. 120 p.
  44. Serrano SMT. The long road of research on snake venom serine proteinases. Vol. 62, *Toxicon*. 2013. p. 19–26.
  45. Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon*. 1982.
  46. Paine MJI, Desmond HP, David R, Theakstons G, Crampton811 JM. Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. *J Biol Chem*. 1992.
  47. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005;45(8):997–1011.
  48. Carvalho BMA, Santos JDL, Xavier BM, Almeida JR, Resende LM, Martins W, et al. Snake venom PLA2s inhibitors isolated from brazilian plants: Synthetic and natural molecules. Vol. 2013, *BioMed Research International*. 2013.
  49. Bonfim VL, De Carvalho DD, Ponce-Soto LA, Kassab BH, Marangoni S. Toxicity of phospholipases A2D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(6):523–32.
  50. Kanashiro MM, De Escocard RCM, Petretski JH, Prates M V., Alves EW, Machado OLT, et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(7):1179–86.
  51. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*.

- 2017.
52. Sen U, Vasudevan S, Subbarao G, McClintock RA, Celikel R, Ruggeri ZM, et al. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. *Biochemistry*. 2001.
  53. Usami Y, Fujimura Y, Suzuki M, Ozeki Y, Nishio K, Fukui H, et al. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993.
  54. Fujimura Y, Holland LZ, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The von Willebrand factor domain-mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein IB lies between Val449 and Lys728. *Blood*. 1987.
  55. Ferrer VP, de Mari TL, Gremski LH, Trevisan Silva D, da Silveira RB, Gremski W, et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5).
  56. Ande SR, Kommoju PR, Draxl S, Murkovic M, MacHeroux P, Ghisla S, et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis*. 2006;11(8):1439–51.
  57. Theakston RDG, Laing GD. Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. Vol. 6, *Toxins*. 2014. p. 1667–95.
  58. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Vol. 29, *Toxicon*. 1991. p. 1279–303.
  59. Sharma SK, Kuch U, Höde P, Bruhse L, Pandey DP, Ghimire A, et al. Use of Molecular Diagnostic Tools for the Identification of Species Responsible for Snakebite in Nepal: A Pilot Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4).
  60. Greenwood BM, Warrell DA, Davidson NMD, Ormerod LD, Reid HA. Immunodiagnosis of Snake Bite. *Br Med J*. 1974;4(5947):743–5.
  61. Boche RD, Russell FE. Passive hemagglutination studies with snake venom and antivenin. *Toxicon* [Internet]. 1968 Oct [cited 2018 Apr 10];6(2):125–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5721657>.
  62. Gawade SP, Gaitonde BB. Immunological studies on monovalent *Enhydrina schistosa* (common sea snake) antivenin. *Toxicon*. 1979;17(Suppl 1):54.
  63. Coulter AR, Fox JC, Sutherland SK, Waddell CJ. A new solid-phase sandwich radioimmunoassay and its application to the detection of snake venom. *J Immunol Methods*. 1978;23(3–4):241–52.
  64. Chávez-Olórtegui C, Penaforte CL, Silva RR, Ferreira AP, Rezende NA, Amaral CFS, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of *Brazilian Bothrops* species and *Crotalus durissus*. *Toxicon*.

- 1997;35(2):253–60.
65. Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: Review on recent trends (1987-1997). Vol. 37, *Toxicon*. 1999. p. 565–86.
  66. Chinonavanig L, Karnchanachetanee C, Pongsettakul P, Ratanabanangkoon K. Diagnosis of snake venoms by a reverse latex agglutination test. *J Toxicol Clin Toxicol* [Internet]. 1991;29(4):493–503. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1749056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1749056).
  67. Minton SA. Present tests for detection of snake venom: Clinical applications. *Ann Emerg Med*. 1987;16(9):932–7.
  68. Rose HM, Ragan C, Pearce E, Lipman MO. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1948.
  69. Zarafonets CJD, Oster HL. Heterophile agglutination variability of erythrocytes from different sheep. *J Lab Clin Med*. 1950.
  70. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test. *Am J Med*. 1956.
  71. Van Den Hul HJ, Vanderhoff JW. Inferences on the mechanism of emulsion polymerisation of styrene from characterisation of the polymer end-groups. *Brit Polym J*. 1970.
  72. Wood WG, Gadow A. Immobilisation of antibodies and antigens on macro solid phases a comparison between adsorptive and covalent binding a critical study of macro solid phases for use in immunoassay systems, Part I. *Clin Chem Lab Med*. 1983;
  73. Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1986.
  74. Cantarero LA, Butler JE, Osborne JW. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal Biochem*. 1980.
  75. El Shahaway AA, El Maghraby HM, Mohammed HA, Abd Elhady RR, Abdelrhman AA. Diagnostic performance of direct latex agglutination, post-enrichment latex agglutination and culture methods in screening of group B *streptococci* in late pregnancy: A comparative study. *Infect Drug Resist*. 2019.
  76. Bryden AS. The evaluation of a combined “dry” latex agglutination test for detecting rotaviruses and adenoviruses in faeces. *Serodiagn Immunother Infect Dis*. 1995.
  77. Schalla WO, Arko RJ, Thompson SE. Evaluation of a C-reactive protein latex agglutination detection test with sera from patients with sexually transmitted diseases. *J Clin Microbiol*. 1984.
  78. Sarkari B, Rezaei Z, Mohebbali M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current

- status and challenges: A review article. Iranian Journal of Parasitology. 2018.
79. Silveira-Gomes F, Sarmiento DN, Pinto TM, Pimentel RF, Nepomuceno LB, Espírito Santo EPT, et al. Development and evaluation of a latex agglutination test for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Clin Vaccine Immunol. 2011.
  80. Khoo O, Wongtongkam N, Pakmanee N, Omori-Satoh T, Sitprija V. Development of reversed passive latex agglutination for detection of Thai cobra (*Naja kaouthia*) venom. J Nat Toxins. 1999.
  81. Chander R, Batra M, Singh D, Kumar Y, Rawat S, Kumar S. A new in-vitro agglutination technique for potency estimation of antsnake venom serum (ASVS). Toxicon. 2006.
  82. Chinonavanig L, Karnchanachetanee C, Pongsettakul P, Ratanabanangkoon K. Diagnosis of snake venoms by a reverse latex agglutination test. Clin Toxicol. 1991;29(4):493–503.
  83. Li3n V, Rojas A, Rodr3guez-Acosta A. Design of an agglutination latex test to detect venoms from Viperidae snakes in patients serum. Rev Cubana Med Trop. 2004.
  84. Amaral CFS, Campolina D, Dias MB, Bueno CM, Ch3vez-Olortegui C, Penaforte CL, et al. Time factor in the detection of circulating whole venom and crotoxin and efficacy of antivenom therapy in patients envenomed by *Crotalus durissus*. Toxicon. 1997.
  85. Griffin, Caryl; Sutor JSB. Microparticle reagent optimization: A laboratory reference manual from the authority on microparticles. Seradyn, editor. Indianapolis; 1994.
  86. WHO - World Health Organization. What is snakebite envenoming? WHO [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 18]; Available from: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>.
  87. Guti3rrez JM, Le3n G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. Vol. 39, Biologicals. 2011. p. 129–42.
  88. Rojas G, Jim3nez J, Guti3rrez J. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. Toxicon. 1994;32(3):351–63.
  89. Espino-Solis GP, Ria3o-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. J Proteomics [Internet]. 2009;72(2):183–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>.
  90. Al-Abdulla I, Garnvwa JM, Rawat S, Smith DS, Landon J, Nasidi A. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). Toxicon. 2003;42(4):399–404.
  91. Habib AG, Warrell DA. Antivenom therapy of carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming: Effectiveness and strategies for delivery in West Africa. Toxicon. 2013;69:82–9.

92. Garfin SR, Castilonia RR, Mubarak SJ, Hargens AR, Akeson WH, Russell FE. The effect of antivenin on intramuscular pressure elevations induced by rattlesnake venom. *Toxicon*. 1985;23(4):677–80.
93. Segura álvaro, Herrera M, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM, León G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals*. 2013.
94. Chippaux J-P, Goyffon M. Production and Use of Snake Antivenin. In [cited 2018 Apr 6]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/b36a/c44f7b956c2aa18c7a80ec78ac41803f7f2b.pdf>.
95. Molina Molina DA, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Costal-Oliveira F, Ávila GR de, Soccol VT, et al. Identification of a linear B-cell epitope in the catalytic domain of bothropasin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Mol Immunol*. 2018.
96. Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody production with synthetic peptides. In: *Methods in Molecular Biology*. 2016.
97. Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1997.
98. dos Santos PO, Rodrigues AM, Fernandes GF, da Silva SHM, Burger E, de Camargo ZP. Immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* Using a Latex Test: Detection of Specific Antibody Anti-gp43 and Specific Antigen gp43. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2).
99. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998.
100. Li Q, Ownby CL. Evaluation of four different immunogens for the production of snake antivenoms. *Toxicon*. 1992.
101. Dos-Santos MC, Yamaguchi IK, Caricatti CP, Higashi HG, Dias-da-Silva W. Immunization of equines with phospholipase A2 protects against the lethal effects of *C.d. terrificus* venom. *Brazilian J Med Biol Res*. 1989.
102. Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Barbosa RL, Corso G, Boschero AC. Biochemical characterization of two crotoamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *C.d. terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2000.
103. Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* [Internet]. 1988;27(2):730–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349062>.
104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin

- phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951.
105. Grodzki AC, Berenstein E. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol Biol.* 2010.
  106. Linow F. *Spectrophotometry & spectrofluorimetry —a practical approach.* Herausgegeben von C. L. Bashford und D. A. Harris. 176 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. IRL Press, Oxford, Washington, DC, 1987.
  107. SDS-PAGE L, SDS T. Laemmli buffer background purpose of the Laemmli buffer Laemmli buffer recipe preparation recommended storage temperature of Laemmli buffer References. *Nature.* 1970;5–6.
  108. Motulsky; H.J. *GraphPad Statistics Guide.* [Internet]. 2020. Available from: <http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>.
  109. Molina F, Laune D, Gougat C, Pau B, Granier C. Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Pept Res* [Internet]. 1996;9(3):151–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8875595](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8875595).
  110. DeLano WL. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.* Schrödinger LLC [Internet]. 2014; <http://www.pymol.org>. Available from: <http://www.pymol.org>.
  111. Rédei GP. Blast (basic local alignment search tool). In: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics.* 2008.
  112. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *J Am Chem Soc.* 1963;85(14):2149.
  113. Gausepohl, H., Boulin, C., Kraft, M., Frank R. Automated multiple peptide synthesis. *Pept Res.* 1992;5(6):315–20.
  114. Merrifield R. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzym Relat Areas Mol Biol* [Internet]. 1969;32:221. Available from: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=AramCV0yCqYC&oi=fnd&pg=PA221&dq=Solid-phase+peptide+synthesis&ots=GQq1DUsqoC&sig=gZV37K0rlUZzuzl7-b9JM4ExXI0>.
  115. Kirby CJ, Gregoriadis G. Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia. *J Microencapsul.* 1984.
  116. Wiegand H. Finney, D. J.: *Probit analysis.* 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge 1971. XV, 333 S., 41 Rechenbeispiele, 20 Diagr., 8 Tab., 231 Lit., L 5.80. *Biom Z.* 1972.
  117. C.-Mendoza CE, Bhatti T, Bhatti AR. Electrophoretic analysis of snake venoms. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1992;580(1–2):355–63.
  118. Hayashi MAF, Nascimento FD, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Pereira A, et al.

- Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon*. 2008;52(3):508–17.
119. Coronado MA, Gabdulkhakov A, Georgieva D, Sankaran B, Murakami MT, Arni RK, et al. Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2013.
  120. Schrödinger L. The PyMOL molecular graphics system, version 1.8. <https://www.pymol.org/citing>. 2015.
  121. Peigneur S, Orts DJB, Prieto da Silva AR, Oguiura N, Boni-Mitake M, de Oliveira EB, et al. Crotamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2012;82(1):90–6. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.112.078188>.
  122. Kattah LS, Santoro MM, Diniz CR, De Lima ME. Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits 3H-choline uptake in guinea pig ileum. *Brazilian J Med Biol Res*. 2000;33(9):1093–7.
  123. Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *J Mol Biol*. 2011.
  124. Faure G, Gowda VT, Maroun RC. Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A2 by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC Struct Biol* [Internet]. 2007;7(1):82. Available from: <http://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-7-82>.
  125. Lomonte B, Rangel J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A 2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*. 2012;60(4):520–30.
  126. Serrano SMT, Mentele R, Sampaio CAM, Fink E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1995;34(21):7186–93.
  127. Parry MAA, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: A prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*. 1998;6(9):1195–206.
  128. Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve Growth Factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1971;68(10):2417–20. Available from: [http://www.pnas.org/content/68/10/2417.abstract?ijkey=fd56d588e252929c82126c610480a277c4583b9a&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://www.pnas.org/content/68/10/2417.abstract?ijkey=fd56d588e252929c82126c610480a277c4583b9a&keytype2=tf_ipsecsha).
  129. Cloud PE, Licari GR, Wright LA, Troxel BW. a Nerve Growth-Stimulating Factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1969;62(3):623–30. Available from: <http://www.pnas.org/content/62/3/623.abstract%5Cnhttp://www.pnas.org/content/62/3/623.full.pdf%5Cnhttp://www.pnas.org/content/62/3/623.short>.



130. Kumar S. Nerve growth factor. *Nature*. 1973;244(5416):471.
131. Muniz JRC, Ambrosio ALB, Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Moura-da-Silva AM, Oliva G, et al. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon*. 2008.
132. Xavier Gomis-Rüth F, Meyer EF, Kress LF, Politi V. Structures of adamalysin II with peptidic inhibitors. Implications for the design of tumor necrosis factor  $\alpha$  convertase inhibitors. *Protein Sci*. 2008.
133. Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. In: *Molecular Nutrition and Food Research*. 2006.
134. Brinkhous KM, Read MS, Fricke WA, Wagner RH. Botrocetin (venom coagglutinin): Reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex (platelet aggregation/von Willebrand factor/ristocetin testing). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983.
135. Van Regenmortel MHV. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. In: *Biologicals*. 2001.
136. Hancock DC, O'Reilly NJ. Synthetic peptides as antigens for antibody production. *Methods Mol Biol*. 2005.
137. Molina-bol Var JA, Galisteo-gonz Lez F. Comprehensive Review Latex Immunoagglutination Assays. *J Macromol Sci* . 2005.
138. Newman DJ, Henneberry H, Price CP. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1992.
139. Lisse JR. Does rheumatoid factor always mean arthritis? *Postgraduate Medicine*. 1993.
140. Bartels EM, Ribel-Madsen S. Cytokine measurements and possible interference from heterophilic antibodies - problems and solutions experienced with rheumatoid factor. *Methods*. 2013.
141. Winder AD, Mora AS, Berry E, Lurain JR. The “hook effect” causing a negative pregnancy test in a patient with an advanced molar pregnancy. *Gynecol Oncol Reports*. 2017.
142. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nature reviews. Disease primers*. 2017.
143. Theakston RDG, Laing GD. Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. *Toxins*. 2014.
144. Georgieva D, Öhler M, Seifert J, Bergen M Von, Arni RK, Genov N, et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*-correlation with pharmacological activities. *J*

- Proteome Res. 2010;9(5):2302–16.
145. Francischetti IM, Gombarovits ME, Valenzuela JG, Carlini CR, Guimarães J a. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2000;127(1):23–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081410>.
  146. Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López JC, Chaves E, et al. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop*. 2002;50(1):337–46.
  147. Boldrini-França J, Corrêa-Netto C, Silva MMS, Rodrigues RS, De La Torre P, Pérez A, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J Proteomics*. 2010;73(9):1758–76.
  148. Cavalcante WLG, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Gallacci M. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 2015;96:46–9.
  149. Teixeira-Araújo R, Castanheira P, Brazil-Más L, Pontes F, Leitão de Araújo M, Machado Alves ML, et al. Antivenomics as a tool to improve the neutralizing capacity of the crotalic antivenom: A study with crotamine. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017.
  150. Sörensen BL. Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. In: Atheneu, editor. *Animais peçonhentos reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos*. Rio de Janeiro/São Paulo; 1990. p. 91–107.
  151. Cardoso DF, Mota I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*. 1997.
  152. Junior RSF, Anderlini RP, Pimenta DC, De Oliveira Orsi R, Barraviera B, Sant’Anna OA. New nanostructured silica adjuvant (SBA-15) employed to produce antivenom in young sheep using *C.d. terrificus* and *Apis mellifera* venoms detoxified by cobalt-60. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2010.
  153. World Health Organization (WHO). Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *Biol Aujourdhui*. 2010.
  154. Duarte CG, Alvarenga LM, Dias-Lopes C, Machado-de-Ávila RA, Nguyen C, Molina F, et al. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine*. 2010;28:1168–76.
  155. Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* [Internet]. 1992;48(42):9217–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004040200185612X>.

156. Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Mol Immunol.* 1978.
157. Finney D. *Probit Analysis.* Cambridge: Cambridge University Press; 1971. 333 p.
158. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003.
159. Bérnils RS, Costa HC. Répteis brasileiros: lista de espécies. *Herpetol Bras.* 2015.
160. Peigneur S, Orts DJB, Prieto da Silva AR, Oguiura N, Boni-Mitake M, de Oliveira EB, et al. Crotonamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. *Mol Pharmacol.* 2012.
161. T.W. J, R.A. H, H. F-C. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1978.
162. Bon C, Changeux J -P, Jeng T -W, Fraenkel-Conrat H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem.* 1979.
163. Allison AC, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature.* 1974.
164. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Corrigendum to “Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens” [*Vaccine* 30 (13) (2012) 2256-2272]. *Vaccine.* 2012.
165. Dyson HJ, Wright PE. Antigenic peptides. *FASEB Journal.* 1995.
166. Harrison R a., Cook D a., Renjifo C, Casewell NR, Currier RB, Wagstaff SC. Research strategies to improve snakebite treatment: Challenges and progress. *J Proteomics* [Internet]. 2011;74(9):1768–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.019>.
167. Bermúdez-Méndez E, Fuglsang-Madsen A, Føns S, Lomonte B, Gutiérrez JM, Laustsen AH. Innovative immunization strategies for antivenom development. *Toxins.* 2018.

## 9 ANEXOS

Artigo submetido na revista International Journal of Biological Macromolecules.

# Immunoprotection against lethal effects of *Crotalus durissus* snake venom elicited by synthetic epitopes trapped in liposomes

Patrícia D. Vaz de Melo<sup>1, 2</sup>, Sabrina de Almeida Lima<sup>1</sup>, Priscila Araújo<sup>1</sup>, Raíssa Medina Santos<sup>1</sup>, Edgar Gonzalez<sup>3</sup>, Andreza Alves Belo<sup>1, 2</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>4</sup>, Fernanda Costal-Oliveira<sup>1</sup>, Vanete T. Soccol<sup>5</sup>, Leonides Rezende<sup>2</sup>, Carlos Chavez-Olortegui<sup>1</sup>

1. *Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*
2. *Labtest Diagnostica SA, Minas Gerais, Brazil.*
3. *Icahn School of Medicine at Mount Sinai, NY, United States of America*
4. *Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil*
5. *Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil.*

\*Corresponding author:

Dr. Carlos Chávez-Olortegui

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

CP: 486. CEP: 30.161-970.

Phone: 5531 3409-2625. Fax: 55313 441 5963

E-mail: [olortegi@icb.ufmg.br](mailto:olortegi@icb.ufmg.br)

## Abstract

Snakebites caused by *Crotalus* genus are the second most frequent ophidian accidents in Brazil. Crotoxin is a beta-neurotoxin responsible for the main envenomation effects upon *Crotalus* biting, while crotamine immobilizes the animal hind limbs, contributing to prey immobilization and to the envenoming symptoms. As crotoxin and crotamine represent about 90% of the dry weight of *Crotalus* venom, these toxins are of great importance for antivenom therapy. In this sense, knowledge regarding the antigenicity/immunogenicity at the molecular level of these toxins can provide valuable information for the improvement of specific antivenoms. Therefore, the aims of this study are the identification of the B-cell epitopes of phospholipase A<sub>2</sub>, crotamine; and the characterization of the neutralizing potency of antibodies directed against the corresponding synthetic epitopes defined in the current study. Linear B-cell epitopes were identified using the Spot Synthesis technique and specific IgG horse anti-*C.d. terrificus* crude venom antibodies. One epitope of crotamine (F<sup>12</sup>PKEKICLPPSSDFGKMDCRW<sup>32</sup>) and three of PLA<sub>2</sub> (L<sup>10</sup>LVGVEGHLLQFNKMIKFETR<sup>30</sup>; Y<sup>43</sup>CGWGGRGRPKDATDRCCFVH<sup>63</sup> and T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCRGPSETC<sup>138</sup>) were identified. After synthesis in their soluble form, the mixture of peptides was entrapped in liposomes and used as immunogens for antibody production in rabbits. Anti-synthetic peptide antibodies were able to protect the lethal activity of *C.d. terrificus* venom.

**Key words:** Epitopes mapping; Antibodies-neutralization; Crotoxin;

## 1.- Introduction

Snakebites are still a serious public health problem in Brazil. About 30,000 cases are reported annually, with a mortality rate of 0.5%. *Crotalus* snakebites account for around 8% of the accidents registered in Brazil, and may represent up to 30% of accidents in some regions. They present the highest lethality coefficient among all snakebite accidents (1.87%), due to the frequency with which they progress to acute kidney injury exceeding those produced by snakes of the genera *Micrurus* or *Lachesis* (10). The venom of *Crotalus durissus terrificus*, the “South American rattlesnake”, comprises toxins from seven protein families: phospholipases A2, serine proteinases, ecto-5'-nucleotidases, metalloproteinases, nerve growth factors, phosphodiesterases, and glutamyl cyclase (13). However, venom pathological effects such as neurotoxicity, systemic myonecrosis, hemostatic disorders, myoglobinuria, and acute renal failure are often attributed to the presence of crotoxin (Ctx), a neurotoxic phospholipase A2 (PLA2), and crotoamine (144). Although marked differences in the concentration of these toxins have been documented among venoms, Ctx accounts for 70–90% of *C.d. terrificus* venom proteome (13,145–148). On the other hand, significant individual variation of crotoamine levels has been observed, ranging from absent to up to 19% of *C.d. terrificus* venom (13)(149).

Due to the high toxicity of *C.d. terrificus* crude venom and Ctx (LD<sub>50</sub> less than 3 µg per 20 g of mice by subcutaneous or intraperitoneal (i.p) route the immunization of animals for antibody production is, self-evidently, a difficult problem. Besides, a low titer of specific antibodies is usually found in the crotalic antiserum due to the presence of an immunosuppressant component in the venom (150). In addition, a reduction in the humoral immune response to classical soluble antigens, after the injection of *C.d. terrificus* crude venom, has been attributed to Ctx (151).

To cope with this problem, the advantage *C.d. terrificus* venom detoxification by cobalt-60 has been shown (152). However, antivenom commercial production using this approach is not a viable option as it has not yet been approved for human consumption and also due to the production costs (153). As peptides derived from the sequence of snake toxins are nontoxic, but may be immunogenic, the generation of anti-peptide antibodies able to recognize the cognate toxin is a promising alternative strategy (95). However, when peptides smaller than 2 kDa are used as antigen, they need to be covalently conjugated to a larger immunogenic carrier protein, for example Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) or Bovine Serum Albumin (BSA), or trapped in liposomes prior to immunization to stimulate antibody responses (154).

The present study reports the preparation of a neutralizing antiserum produced by rabbit immunization with defined synthetic epitopes of Ctx and crotoamine trapped in L-α-

lecithin/cholesterol liposomes. We have used the Spot method of multiple peptide synthesis (109,155) to prepare sets of immobilized overlapping peptides of uniform size, covering the complete amino acid sequences of both PLA2 and crotoxin. Three main antigenic regions were revealed using anti-*C.d. terrificus* venom horse IgGs, one in the N-terminal, the second in the central part, and a third one in the C-terminal part of PLA2. Furthermore, one epitope in the central region of crotoxin was identified with anti-*C.d. terrificus* neutralizing horse antibodies. These sequences incorporated in liposomes were able to produce anti-peptide antibodies capable of neutralizing the *in vivo* toxic effects of the *C.d. terrificus* venom.

## **2.- Materials and methods**

### **2.1.- Animals, venom and antivenoms**

Female New Zealand white rabbits weighing 2 kg were supplied by Fazenda da Escola de Veterinária of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Male Swiss white mice weighing 18-22 g were supplied by the Centro de Bioterismo of Instituto de Ciências Biológicas of UFMG. All animals were housed at 25 °C on a 12 hours light/dark cycle and received food and water *ad libitum*, under controlled environmental conditions. Experimental protocols were performed after approval by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFMG (145/2019-CETEA/UFMG).

*C.d. terrificus* crude venom was kindly supplied by Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Crotoxin and Ctx were purified from the *C.d. terrificus* venom as described by Tayama MH, *et al*, and Faune G, *et al* (102,103), respectively, and kept frozen at -20 °C until its use. Protein concentration was measured by Lowry method (104).

Anticrotalic plasmas from hyperimmune horses were obtained following the standard immunization schedule of the Unidade de Produção de Imunobiológicos of FUNED (156). IgG precipitation from plasma of horse immunized with *C.d. terrificus* venom or from non-immunized horse was obtained by homogenization with saturated ammonium sulphate in the 1:1 plasma ratio. The mixture was stored for 8 to 12 hours under refrigeration followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes at 4°C. Dialysis was performed against 15 mM PBS for 24 hours at 2-8 °(105).

### **2.2.- Immunoaffinity purification of venom-specific IgGs for epitope mapping**

An affinity column was prepared by conjugating *C.d. terrificus* venom to CNBr-Sepharose, according to the manufacturer's instructions (Pharmacia). Briefly, 1 g of CNBr-

activated Sepharose was incubated overnight at 4°C with 20 mg of the *C.d. terrificus* venom in coupling buffer (100 mM sodium bicarbonate, 500 mM NaCl, pH 8.3). It was then washed with the same buffer and further incubated with 100 mM Tris-HCl buffer to block the remaining active sites before a final washing. Sepharose-venom was packed in a 6 mL column and washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Anti- *C.d. terrificus* IgG antibodies were separated on the Sepharose-*C.d. terrificus* venom column as described by (64). Antigenicity of anti-*C.d. terrificus* immunopurified antibodies was assessed by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), as previously described (64).

### 2.3.- Peptide synthesis on cellulose membranes

Sets of overlapping pentadecapeptides frame-shifted by three residues corresponding to the amino acid sequence of crostamine (Uniprot entry code Q9PWF3) with 10 spots or Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc (Uniprot entry code P62022) with 42 spots, were prepared on cellulose membranes by Spot synthesis, as previously described (109). The membranes were obtained from Intavis (Koln, Germany) and the F-moc amino acids from Novabiochem. A Multiprep robot was used for peptide synthesis. All peptides were acetylated at the N-terminus. After the peptide sequences had been assembled, the side-chain protecting groups were removed by trifluoroacetic acid treatment (155).

### 2.4.- Antibody binding to cellulose-bound peptides

After an overnight saturation step with a blocking buffer containing 3% sucrose, 2% bovine albumin in TBS-T pH 7 (50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.1% Tween 20), the set of membrane bound peptides was probed with non-immune IgG or anti-*C.d. terrificus* IgG (both 35 µg/mL) for 90 min at room temperature. After washing, the membrane was incubated with an alkaline phosphatase-conjugated anti-horse antibody (Sigma Ref. A6063, diluted 1:3000) for 1 h at room temperature. The spots were washed twice with TBS-T followed by other two washes with of CBS pH 7 (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM citric acid monohydrated) and substrate (120 µL MTT, 100 µL BCIP, 80 µL MgCl<sub>2</sub>, to 20 mL of CBS) were added to each well, for 30 minutes.

Membranes were sequentially treated by dimethylformamide, reagent A (8M urea and 20% Sodium Dodecyl Sulphate), and reagent B (10% acetic acid and 50% ethanol) to remove the precipitated dye and molecules bound to peptides. This regeneration procedure permits the membrane use for at least 10 times, without decreasing color intensity. ImageJ, a public domain Java-based image processing program, was used to measure spots intensities by



calculating area and pixel value of user-defined selections. Images were analyzed at 8-bit grey scale level.

## 2.5.- Localization of epitopes in 3D toxin structures

The most reactive peptides selected in the Spot immunoassay, which presented residues considered essential for the antibody recognition, were spatially identified in the protein models. The crystal structure of Crotoxin B, PDB file code 4GV5 (31) and 2QOG (28), respectively, were used to build the proteins models. Epitope localization was analyzed in the three-dimensional structures of the proteins using PyMOL Molecular Graphics System (110).

## 2.6.-Peptides synthesis

The peptide sequence was defined based on the amino acid sequence of the spot with highest pixel intensity obtained in the spot assay using the immunopurified anti-*C. d. terrificus* IgG. The sequence of the previous and posterior spots were also incorporated in the peptide, totalizing 21 residues. According to cellulose-bound peptides assay results analysis, four sequences were identified as main putative epitopes and were selected to be synthesized in the soluble form: F<sup>12</sup>PKEKICLPPSSDFGKMDCRW<sup>32</sup> from crotoxin B (entry Q9PWF3) named Crotam1; L<sup>10</sup>LVGVEGHLLQFNKMIKFETR<sup>30</sup>; Y<sup>43</sup>CGWGGRGRPKNATDRCCFVH<sup>63</sup> and T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCRGPSETC<sup>138</sup> from crotoxin B (entry P62022), named, respectively, Ctx2, Ctx3 and Ctx4. All peptides were prepared by Fmoc synthesis immobilized to a Rink Amide resin (Novabiochem). Amino acids were purchased from Sigma Aldrich and coupling steps were performed using a ResPep robot (Intavis), as described by (113). The peptides were N-terminally acetylated and C-terminally amidated during the synthesis. Peptides were released from the resin and amino acid side-chain deprotection was achieved using a 95% TFA, 2.5% triisopropylsilane and 2.5% water cocktail. Crotam1, Ctx2, Ctx3 and Ctx4 molecular mass were confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF) linear mode.

## 2.7. Liposome preparation and peptide incorporation

The four synthetic peptides were encapsulated in liposomes using the freeze -thaw method (115). Briefly, multi-lamellar vesicles were prepared using a mixture of 24.1 mg of L- $\alpha$ -Lecithin from Soybean (Sigma) and 9.8 mg of cholesterol (CHOL, Sigma) dissolved in 10 mL of chloroform (FMAIA) at a final lipid concentration of 3.4 g/L. The lipid mixture was added to a

50 mL round-bottom flask with a long extension neck, and the solvent was removed under reduced pressure by a rotary evaporator. The lipid film was hydrated with 2 mL PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate, pH 7.2) containing 500 µg of each soluble peptide. The mixture was vortexed and the suspension was frozen in liquid nitrogen then thawed at 40°C. Both steps were repeated five times (115).

## 2.8. - Immunization protocols

Adult female New Zealand white rabbits (2.0–2.5 kg) were used for antibody production. After pre-immune serum collection, rabbit 1 (control) received liposome in 4% aluminum hydroxide and rabbit 2, 3 and 4 received an intraperitoneally initial injection a mixture composed of 1 mg of the four synthetic peptides entrapped in liposome in 4% aluminum hydroxide (day 1). Animals received nine similar booster injections with 15-day interval. Blood samples were withdrawn 1 week after the last injection.

## 2.9.- ELISA

ELISA plates (Costar High binding Cat. 3590) were coated with *C.d. terrificus* venom (5 µg/mL), crotamine (5 µg/mL) or Ctx (5 µg/mL) over night at 2-8 °C. Plates coated with the peptides Crotam1 (10 µg/mL), Ctx2 (10 µg/mL), Ctx3 (10 µg/mL) or Ctx4 (10 µg/mL) were incubated over night at 37 °C. All samples were diluted in coating buffer (0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.6). Plates were later blocked with PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween 20. Immunopurified *anti-C.d. terrificus* (2.5 µg/mL) serum from immunized rabbit 2 (antipeptides) (1:100) or serum from rabbit 1 (control) (1:100) were added to the wells. To demonstrate the specificity of antipeptides, serum from rabbit 2, 3, 4 were diluted 1:100 until 1:3200 and incubated for one hour at 37 °C. Sheep IgG anti-horse conjugated to peroxidase (1:16000) or goat IgG anti-rabbit conjugated to peroxidase (1:10000), (both from Sigma-Aldrich), and OPD substrate (Sigma-Aldrich) were used to detect the reaction.

## 2.10.- Neutralization assays

*C.d. terrificus* venom toxicity was first evaluated. Three groups of six male Swiss mice received varying amounts of venom diluted in 100 µL of PBS via (i.p.) injection. Surviving mice were counted 24 and 48h after the injection. *C.d. terrificus* venom LD50 was determined as 2 µg per 20 g mouse using Probit (157).

In order to assess the neutralization of lethal activity of *C.d. terrificus* venom in mice, eight groups of six animals were used. Each mouse received 0.2 mL (i.p.) of a solution containing 7 LD<sub>50</sub> of *C.d. terrificus* venom in PBS, pre-incubated for 1 h at 37°C either with 100 µL or 50 µL of serum from immunized rabbit 2, 3 or 4; or 200 µL of serum from the control rabbit. Animals were observed 24 and 48h after the injection. After this period, deaths were counted.

### 3.- Results

#### 3.1.- Identification of Epitopes in Crotoxin B

To map linear B-cell epitopes on Crotoxin B, 10 overlapping 15-mer peptides (Table 1) covering the complete amino acid sequence of the enzyme were prepared using the SPOT synthesis method (25). Binding between anti-*C.d. terrificus* antibodies and membrane-bound peptides showed to be specific since neither non-immune IgG (Fig. 1A) or alkaline phosphatase labeled anti-horse antibody (data not shown), both 35 µg/mL, showed reactivity with the membrane. Fig. 1B shows the binding pattern of IgG anti-*C.d. terrificus* venom (35 µg/mL) to the membrane-bound peptides. Three peptides, in the central region (peptides 5 – 7), were recognized by the antibodies. *In silico* analysis showed that residues 12–32 are exposed in the surface of the three-dimensional model of this toxin (Fig. 1C), consistent with their antigenic recognition by anti-*C.d. terrificus* polyclonal antibodies. Thus, the amino acid sequence of the peptide (F<sup>12</sup>PKEKICLPPSSDFGKMDCRW<sup>32</sup>) corresponding to the continuous epitopes in the central region (P<sup>13</sup>KEKICLPPSSDFGK<sup>27</sup>; K<sup>16</sup>ICLPPSSDFGKMDC<sup>30</sup>; L<sup>19</sup>PPSSDFGKMDCRWR<sup>33</sup>) was chosen to integrate the peptide sequence of Crotoxin B. The localization of the epitope analyzed in the three-dimensional structure of the protein using PyMOL Molecular Graphics System (110) is presented in Fig. 1C. Residues potentially involved in the interaction surface toward voltage-gated potassium (K(V)) channels (121), Arg 31 and Trp 32, are represented in blue.

To map linear B-cell epitopes on Crotoxin A, a PLA2, 42 overlapping 15-mer peptides covering the complete amino acid sequence of the enzyme (Table 2) were prepared by the SPOT synthesis method (25). Fig. 2B shows the binding pattern of horse IgG antibodies anti-*C.d. terrificus* venom to the membrane-bound peptides. Differently from the results obtained for crotoxin B, more peptides (nine) were recognized by these antibodies in the N-terminal region of Crotoxin A (peptides 4–6). Peptide 4 has amino acids pertaining to the signal peptide of PLA2, however, we considered them to construct the soluble peptide named Crotoxin A2. The sequence of Crotoxin A2 (L<sup>10</sup>LVGVEGHLLQFNKMIKFETR<sup>30</sup>), corresponds to the continuous epitopes L<sup>10</sup>LVGVEGHLLQFNKM<sup>24</sup>, G<sup>13</sup>VEGHLLQFNKMIKF<sup>27</sup> and G<sup>16</sup>HLLQFNKMIKFETR<sup>30</sup>. The

soluble peptide Ctx3 was constructed based on the sequences of peptides 15-17, Y<sup>43</sup>CGWGGRGRPDKATD<sup>57</sup>; W<sup>46</sup>GGRGRPDKATDRCC<sup>60</sup> and R<sup>49</sup>GRPDKATDRCCFVH<sup>63</sup>, respectively, which are located in the middle region of PLA2. The amino acid sequence of Ctx3 (Y<sup>43</sup>CGWGGRGRPDKATDRCCFVH<sup>63</sup>) has Tyr 43, Gly 45 and Gly 47, which are residues structurally related to Ca<sup>2+</sup> coordination (28). In the C-terminal region of Ctx, the most intensely spots recognized by the anti-cdt antibodies, correspond to peptides 40 (T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCR<sup>132</sup>), 41 (Y<sup>121</sup>GYMFYPDSRCRGP<sup>135</sup>) and 42 (M<sup>124</sup>FYPDSRCRGPSETC<sup>138</sup>), and for that reason these sequences were chosen to compose the soluble peptide Ctx4 (T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCRGPSETC<sup>138</sup>). The localization of the epitopes Ctx2, Ctx3 and Ctx4 on the PLA2 were analyzed in the three-dimensional structure of the protein using PyMOL Molecular Graphics System (110) and is presented in Fig. 2C.

### 3.2.- Antipeptides serum production and neutralization assays

Four peptides, identified by systematic mapping of continuous epitopes recognized by immunopurified IgGs anti-*C.d. terrificus* venom were synthesized and named as Crotam1, Ctx2, Ctx3 and Ctx4, respectively. Their characteristics as source protein, residue sequence, molecular weight and isoelectric point are found in Table 3.

A suspension of liposomes containing a mixture of the soluble peptides was used to immunize three rabbits. The reactivity of rabbit anti-peptide antibodies against *C.d. terrificus* venom, crotamine or Ctx was evaluated by ELISA as shown in the Fig. 3A. The reactivity against individual peptides is shown in the Fig.3B.

Anti- *C.d. terrificus* IgG reacted with the *C.d. terrificus* venom with absorbance of  $0.737 \pm 0.019$  (mean  $\pm$  standard deviation) and with Ctx with absorbance of  $0.663 \pm 0.012$ . The recognition of crotamine was  $0.130 \pm 0.009$ , being less intense than the observed for *C.d. terrificus* venom and Ctx. On the other hand, antipeptide presented higher reactivity for Ctx ( $0.349 \pm 0.03$ ) when compared to the venom ( $0.087 \pm 0.006$ ) and crotamine ( $0.039 \pm 0.03$ ). Serum from rabbit 1 (control) was unable to recognize venom or proteins resulting in absorbances that did not exceed 0.120 nm (Fig 3A). Regarding the antipeptides IgGs recognition ability, it was observed a statistically significant stronger binding to the Ctx2 ( $1.002 \pm 0.026$ ) than to the control ( $0.095 \pm 0.048$ ). Ctx4 also showed a more intense recognition by the antipeptides ( $0.593 \pm 0.015$ ) when compared to the control ( $0.096 \pm 0.011$ ) and Ctx3 ( $0.360 \pm 0.007$ ) than control  $0.137 \pm 0.011$ . Anti-peptides antibodies binding to Crotam1 presented absorbance of  $0.403 \pm 0.012$ , which was similar to control  $0.450 \pm 0.063$  (Fig. 3B).

Finally, the ability of the antipeptides to neutralize the venom lethal activity was verified. To demonstrate the efficacy of antipeptides antibodies to neutralize venom lethality, antibodies were diluted 1:4 and 1:2 with PBS, mixed, pre-incubated with 7 LD50 of *C.d. terrificus* venom

and injected into mice. The resulting survival rate was 8% and 42% with antipeptides from rabbit 2; 33% and 50% from rabbit 3 and 16% and 50% from rabbit 4, respectively at dilutions 1:4 and 1:2. All animals injected with the same dose of venom pre-incubated with control serum died within 24 h (Table 4).

#### 4.- Discussion

Snakebites are well-known medical emergencies in many parts of the world, especially in rural areas where workers and children are the most affected (142). Due to the high number of notifications, animal accidents have been included in the Brazil Compulsory Notification List (43). In Brazil, all of the six subspecies of *Crotalus durissus* (*C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella*, and *C. d. collilineatus*) are capable of producing lethal envenomation in humans, since their venoms exhibit systemic neuro and myotoxic activities (158,159). Anticrotalic antivenom is the only therapeutic product to prevent or reverse most of the harmful effects of snakebite envenoming and is included in the WHO list of essential medicines (153).

This study aimed to measure the protective response induced in rabbits by peptides derived from crotamine and Ctx sequences, the major toxic components of *C.d. terrificus* snake venom. Precipitation and purification techniques, ELISA and Spot-Synthesis method, were combined to identify amino acid sequences responsible for inducing the production of specific antibodies against *C.d. terrificus* venom (18, 48). Overlapping peptides covering the sequence of the Crotamine (Uniprot code Q9PWF3) and Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc (Uniprot code P62022) were synthesized, and their recognition by horse anti-*C.d. terrificus* antibodies was assessed. Four different antigenic regions were disclosed, one from crotamine and three from Ctx (Table 1 and 2). The antigenic regions of crotamine is constituted by three peptides (15-17) found in the protein central region, which were chosen to integrate the Crotam1 epitope (<sup>12</sup>FPKEKICLPPSSDFGKMDCRW<sup>32</sup>). These crotamine epitope is situated in the  $\alpha$ -helix and it is adjacent to the sheet strand (Figure 1C) that contains Arg 31 and Trp 32, which might be involved in the inhibition of voltage-gated potassium (K(V)) channels associated with toxic effects like skeletal muscle spasm (160).

The mapping of Crotoxin B, that consists of weakly toxic basic phospholipase A2, when complexed with a nonenzymatic, non-toxic acidic component A (CA, crotapotin) (122), revealed three immunodominant peptides strongly bound to anti-*C.d. terrificus* antibodies, which were used to compose the Ctx2 epitope (L<sup>10</sup>LVGVEGHLLQFNKMIKFETR<sup>30</sup>). Ctx2 is located in the N- terminal region of the protein, between the first and the fourth  $\alpha$ -helices (Figure 2C), and contains a His 17 which forms more stable and highly toxic complexes with the CA subunit (29). CA subunit is not neurotoxic, but it is responsible for increasing the lethal

potency of the uncomplexed CB by diminish the nonspecific binding tendency of component B (161,162). Other three peptides located in the central region of PLA2 are components of the Ctx3 epitope (Y<sup>43</sup>CGWGGRGRPKDATDRCCFVH<sup>63</sup>) (Figure 2C) and has Tyr 43; Gly 45 and Gly 47, which are related to Ca<sup>2+</sup> binding (29) cofactor required to the enzymatic activity. The last epitope, named Ctx4 (T<sup>118</sup>YKYGYMFYPDSRCRG<sup>133</sup>PSETC<sup>138</sup>), is composed by three immunodominant peptides located on the C-terminal region (Figure 2C). This peptide has a Gly 133, responsible for the higher anticoagulant activity compared to CBa2 (124). This C-terminal region is amphiphilic, contains several positively charged residues, and is known to be critical for toxicity by nonenzymatic disruption of the plasma membrane of skeletal muscle fibers (125). Crotoxin B epitopes mapping presented here is in agreement with those previously described in crystallography studies, which suggest that the most probable sites related to the neurotoxic activity (N and C-terminal regions, Ca<sup>2+</sup> binding loops and  $\beta$ -wings) are exposed on the surface of the tetramer and its isolated constituent dimers (28). Therefore, these regions may be involved in the anti-crotalic antibodies capacity to neutralize the toxin neurotoxic effects.

The four epitopes were chemically synthesized in a soluble form, trapped in liposomes and used as immunogens together with aluminum hydroxide adjuvant. We demonstrated that rabbit's immunization with these trapped epitopes rendered high levels of reactive antibodies, suggesting that immunogenicity was conferred by combined delivery technique and formulation with adjuvants. Since the 1970s, it has been known that liposomal presentation of antigens can confer greater immunogenicity when compared to the antigen alone (163). Some advantages of liposomal vaccines are an opportunity for antigen dose-sparing, plasticity with regard to lipid composition and recruitment of various components of the immune system (164). In addition, liposomes also provide a physical means for either delivering encapsulated antigens or presenting surface-associated antigens with the ability to modulate epitope density and homogeneity.

The antibody response after immunization with synthetic epitopes against the *C.d. terrificus* venom, crotamine and Ctx, and against the individual synthetic epitopes was evaluated by ELISA (Figure 3A). Through these assays, it was possible to detect a significantly higher antibody response against Ctx ( $p < 0.001$ ) and *C.d. terrificus* venom ( $p < 0.05$ ) than those of control antibodies. It was observed that peptides Ctx2 ( $p < 0.0001$ ), Ctx3 ( $p < 0.0001$ ) and Ctx4 ( $p < 0.0001$ ) elicited a strong antibody response, whereas the Crotam1 was not immunogenic (Figure 3B). Based on the 3D structure of Crotoxin B (28) it was able to demonstrate the surface exposure of three epitopes, as well as residues important to the of PLA2 stability and activity, showing its availability for binding to antipeptides antibodies (Figure 2C). Nevertheless, the location of Ctx2 and Ctx4, respectively N- and C- terminal of Crotoxin

B, regions with a great exposure and flexibility degree (165), may explain the higher peptides antigenicity when compared to CTX3, located in the middle of the protein sequence. Antipeptides antibodies specific binding was demonstrated by ELISA. As antibody titer increases, peptides recognition also increases. In all titers it is evident that the Ctx2, Ctx3 and Ctx4 peptides were able to induce antibody production more intensely than Crotam1 (Figure 3B).

In the last part of this study, the neutralization of lethality by anti-epitopes/peptides antibodies was evaluated. These antibodies were able to reduce the lethal activity caused by *C.d. terrificus* venom. Mice that received only *C.d. terrificus* venom diluted in PBS or a mixture of venom pre-incubated with antibodies from the control group did not survive. Nevertheless, venom pre-incubated with plasma from immunized rabbits showed an enhanced survival rate when compared to the control group, suggesting that the immunization induced the production of neutralizing antibodies (Table 4).

Antivenoms are produced through the immunization of large animals with whole venom, which are a mixture of non-toxic and toxic components. Many of the venom molecules are not antigenic due to their low molecular weight and consequently antivenoms have a large percentage of nonspecific antibodies, which when administered can induce delayed or immediate hypersensitivity reactions in the patient (166). Therefore, the identification of the toxins responsible for the envenoming condition is a determining step in the development of optimal mixtures of antigens for immunization (167), as well as is the design of synthetic and non-toxic peptides. For this purpose, the combination of immunopurified anti-*C.d. terrificus* antibodies increased the specificity in the epitope mapping, associated with the synthesis of soluble peptides from twenty-one residues attached to liposomes were techniques used to improve the production of antipeptide antibodies with high recognition capacity for antigens. These strategies to increase their antigenicity, induced the production of neutralizing antipeptides antibodies, therefore, it could replace the use of *C.d. terrificus* venom in the antivenoms production.

The role of Ctx as major antigen was evidenced by immunological and neutralization assays, by demonstrating that peptides composed mainly of amino acid sequences of this protein elicited antibodies capable to reduce the lethal activity of *C.d. terrificus* whole venom.

To conclude, the use of the non-toxic linear peptides identified from Ctx can be an alternative in the production of antivenom, reducing the use of venom or increasing its effectiveness, since the reduction of lethality has been demonstrated. In addition, as peptides are easily synthesized by biotechnological methods and are less aggressive to animal health

than crude venom, it is possible to achieve both a reduction in the number of snakes kept in captivity and an increase in life expectancy of the serum producer animal.

## Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq) (Process: 406163/2018-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil - CAPES (Program COFECUB Process: [88881.191812/2018-01](#)) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG).

## References

1. Chippaux JP. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! Vol. 23, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2017.
2. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. Vol. 72, *Journal of Proteomics*. 2009. p. 165–82.
3. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:17063. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201763>
4. Mohapatra B, Warrell DA, Suraweera W, Bhatia P, Dhingra N, Jotkar RM, et al. Snakebite mortality in India: A nationally representative mortality survey. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4).
5. Chippaux JP. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: A meta-analytic approach. *Toxicon*. 2011;57(4):586–99.



6. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Lalloo DG. Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(12).
7. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. Vol. 76, *Bulletin of the World Health Organization*. 1998. p. 515–24.
8. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 2008;5:e218.
9. Ministério da Saúde B. Dados epidemiológicos: Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil [Internet]. [cited 2018 Jan 4]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.
10. Brasil M da S. TabNet Win32 3.0: Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil [Internet]. [cited 2018 Mar 14]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.
11. Warrell DA. Snake bite. Vol. 375, *The Lancet*. 2010. p. 77–88.
12. Fry BG, Casewell NR, Wüster W, Vidal N, Young B, Jackson TNW. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Toxicon*. 2012;60(4):434–48.
13. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, De La Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, et al. Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J Proteome Res*. 2010;9(1):528–44.
14. Gonçalves-Machado L, Pla D, Sanz L, Jorge RJB, Leitão-De-Araújo M, Alves MLM, et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. *J Proteomics*. 2016;135:73–89.
15. Damico DCS, Lilla S, De Nucci G, Ponce-Soto LA, Winck F V., Novello JC, et al. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2005;1726(1):75–86.
16. BRASIL, Saúde M da, Saúde S de V em, Serviços C-G de D da E em. Guia de Vigilância

em Saúde: volume único. Ministério da Saúde 2017.

17. Amaral CF, de Rezende NA, da Silva OA, Ribeiro MM, Magalhães RA, dos Reis RJ, et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986;28(4):220–7.
18. Rádis-Baptista G, Moreno FBMB, Nogueira LDL, Martins AMC, Toyama DDO, Toyama MH, et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. In: *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2006. p. 412–23.
19. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Vol. 36, *Toxicon*. 1998. p. 823–46.
20. Parkinson CL, Campbell JA, Chippindale PT. Multigene phylogenetic analysis of pitvipers, with comments on their biogeography. *Biol Vipers*. 2002;(July 2014):93–110.
21. Shine R. Snakes. The evolution of mystery in nature - Greene,HW. *Science* (80- ). 1997;277:1945–6.
22. Wüster W, Ferguson JE, Quijada-Mascareñas JA, Pook CE, Salomão MDG, Thorpe RS. Tracing an invasion: Landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol Ecol*. 2005;14(4):1095–108.
23. Fundação Ezequiel Dias F. Animais Peçonhentos [Internet]. [cited 2018 Mar 15]. Available from: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2010/03/cartilha.pdf>.
24. University of Florida. Compare Rattlesnake Rattles :: Florida Museum of Natural History [Internet]. [cited 2018 Mar 26]. Available from: <https://www.floridamuseum.ufl.edu/herpetology/fl-snakes/compare7>
25. Kattah LR, Ferraz V, Matos Santoro M, Ribeiro Da Silva Camargos E, Ribeiro Diniz C, De Lima ME. Analysis of fatty acids released by crotoxin in rat brain synaptosomes. *Toxicon*. 2002;
26. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. Vol. 65, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. p. 2897–912.
27. BON C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A2. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism,. In: Kini, RM, editors. Wiley Chichester. 1997. 269–285 p.

28. Marchi-Salvador DP, Corrêa LC, Magro AJ, Oliveira CZ, Soares AM, Fontes MRM. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *C.d. terrificus* venom. *Proteins Struct Funct Bioinforma* [Internet]. 2008 Feb 14 [cited 2018 Jan 10];72(3):883–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.21980>
29. Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *J Mol Biol.* 2011;412(2):176–91.
30. Coronado MA, Georgieva D, Buck F, Gabdoulkhakov AH, Ullah A, Spencer PJ, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotamine, a myotoxic polypeptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2012;68(9):1052–4.
31. Coronado MA, Gabdulkhakov A, Georgieva D, Sankaran B, Murakami MT, Arni RK, et al. Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2013;69(10):1958–64.
32. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1427–35.
33. Chang CC, Tseng KH. Effect of crotamine, a toxin of south american rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br J Pharmacol.* 1978;63(3):551–9.
34. Mancin AC, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Faça VM, Greene LJ, Zuccolotto S, et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *C.d. terrificus* (South American rattlesnake) venom: A biochemical and pharmacological study. *Toxicon.* 1998;36(12):1927–37.
35. Yonamine CM, Prieto-da-Silva ARB, Magalhães GS, Rádis-Baptista G, Morganti L, Ambiel FC, et al. Cloning of serine protease cDNAs from *C.d. terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon.* 2009;54(2):110–20.
36. Kozako T, Kawachi A, Cheng S Bin, Kuchiiwa S, Motoya T, Nakagawa S, et al. Role of the vestibular nuclei in endothelin-1-induced barrel rotation in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;454(2–3):199–207.
37. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Brazilian J Med Biol Res.* 1986;19(3):333–8.

38. Kostiza T, Dahinden CA, Rihs S, Otten U, Meier J. Nerve growth factor from the venom of the chinese cobra *Naja naja atra*: Purification and description of non-neuronal activities. *Toxicon*. 1995;33(10):1249–61.
39. Kostiza T, Meier J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon*. 1996;34(7):787–806.
40. Rádis-Baptista G, Moreno FBMB, de Lima Nogueira L, Martins AMC, de Oliveira Toyama D, Toyama MH, et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochem Biophys* [Internet]. 2006 [cited 2018 Jan 10];44(3):412–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679528>.
41. Drickamer K. C-type lectin-like domains. Vol. 9, *Current Opinion in Structural Biology*. 1999. p. 585–90.
42. Fry BG, Wuster W. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Mol Biol Evol*. 2004;21(5):870–83.
43. Ministério da Saúde, da Saúde M. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2001. 120 p.
44. Serrano SMT. The long road of research on snake venom serine proteinases. Vol. 62, *Toxicon*. 2013. p. 19–26.
45. Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon*. 1982;
46. Paine MJI, Desmond HP, David R, Theakstons G, Crampton811 JM. Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. *J Biol Chem*. 1992;
47. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005;45(8):997–1011.
48. Carvalho BMA, Santos JDL, Xavier BM, Almeida JR, Resende LM, Martins W, et al. Snake venom PLA2s inhibitors isolated from brazilian plants: Synthetic and natural molecules. Vol. 2013, *BioMed Research International*. 2013.
49. Bonfim VL, De Carvalho DD, Ponce-Soto LA, Kassab BH, Marangoni S. Toxicity of

- phospholipases A2D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(6):523–32.
50. Kanashiro MM, De Escocard RCM, Petretski JH, Prates M V., Alves EW, Machado OLT, et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(7):1179–86.
  51. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins.* 2017.
  52. Sen U, Vasudevan S, Subbarao G, McClintock RA, Celikel R, Ruggeri ZM, et al. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. *Biochemistry.* 2001.
  53. Usami Y, Fujimura Y, Suzuki M, Ozeki Y, Nishio K, Fukui H, et al. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;
  54. Fujimura Y, Holland LZ, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The von Willebrand factor domain-mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein IB lies between Val449 and Lys728. *Blood.* 1987.
  55. Ferrer VP, de Mari TL, Gremski LH, Trevisan Silva D, da Silveira RB, Gremski W, et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5).
  56. Ande SR, Kommoju PR, Draxl S, Murkovic M, MacHeroux P, Ghisla S, et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis.* 2006;11(8):1439–51.
  57. Theakston RDG, Laing GD. Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. Vol. 6, *Toxins.* 2014. p. 1667–95.
  58. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Vol. 29, *Toxicon.* 1991. p. 1279–303.
  59. Sharma SK, Kuch U, Höde P, Bruhse L, Pandey DP, Ghimire A, et al. Use of Molecular Diagnostic Tools for the Identification of Species Responsible for Snakebite in Nepal: A Pilot Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4).
  60. Greenwood BM, Warrell DA, Davidson NMD, Ormerod LD, Reid HA. Immunodiagnosis of Snake Bite. *Br Med J.* 1974;4(5947):743–5.
  61. Boche RD, Russell FE. Passive hemagglutination studies with snake venom and

- antivenin. *Toxicon* [Internet]. 1968 Oct [cited 2018 Apr 10];6(2):125–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5721657>.
62. Gawade SP, Gaitonde BB. Immunological studies on monovalent *Enhydrina schistosa* (common sea snake) antivenin. *Toxicon*. 1979;17(Suppl 1):54.
  63. Coulter AR, Fox JC, Sutherland SK, Waddell CJ. A new solid-phase sandwich radioimmunoassay and its application to the detection of snake venom. *J Immunol Methods*. 1978;23(3–4):241–52.
  64. Chávez-Olórtegui C, Penaforte CL, Silva RR, Ferreira AP, Rezende NA, Amaral CFS, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian *Bothrops* species and *Crotalus durissus*. *Toxicon*. 1997;35(2):253–60.
  65. Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: Review on recent trends (1987-1997). Vol. 37, *Toxicon*. 1999. p. 565–86.
  66. Chinonavanig L, Karnchanachetanee C, Pongsettakul P, Ratanabanangkoon K. Diagnosis of snake venoms by a reverse latex agglutination test. *J Toxicol Clin Toxicol* [Internet]. 1991;29(4):493–503. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1749056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1749056)
  67. Minton SA. Present tests for detection of snake venom: Clinical applications. *Ann Emerg Med*. 1987;16(9):932–7.
  68. Rose HM, Ragan C, Pearce E, Lipman MO. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1948;
  69. Zarafonitis CJD, Oster HL. Heterophile agglutination variability of erythrocytes from different sheep. *J Lab Clin Med*. 1950;
  70. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test. *Am J Med*. 1956;
  71. Van Den Hul HJ, Vanderhoff JW. Inferences on the mechanism of emulsion polymerisation of styrene from characterisation of the polymer end-groups. *Brit Polym J*. 1970.
  72. Wood WG, Gadow A. Immobilisation of antibodies and antigens on macro solid phases a comparison between adsorptive and covalent binding a critical study of macro solid

- phases for use in immunoassay systems, Part I. Clin Chem Lab Med. 1983;
73. Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. Advances in Colloid and Interface Science. 1986.
  74. Cantarero LA, Butler JE, Osborne JW. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. Anal Biochem. 1980;
  75. El Shahaway AA, El Maghraby HM, Mohammed HA, Abd Elhady RR, Abdelrhman AA. Diagnostic performance of direct latex agglutination, post-enrichment latex agglutination and culture methods in screening of group B *streptococci* in late pregnancy: A comparative study. Infect Drug Resist. 2019.
  76. Bryden AS. The evaluation of a combined “dry” latex agglutination test for detecting rotaviruses and adenoviruses in faeces. Serodiagn Immunother Infect Dis. 1995.
  77. Schalla WO, Arko RJ, Thompson SE. Evaluation of a C-reactive protein latex agglutination detection test with sera from patients with sexually transmitted diseases. J Clin Microbiol. 1984.
  78. Sarkari B, Rezaei Z, Mohebbali M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current status and challenges: A review article. Iranian Journal of Parasitology. 2018.
  79. Silveira-Gomes F, Sarmiento DN, Pinto TM, Pimentel RF, Nepomuceno LB, Espírito Santo EPT, et al. Development and evaluation of a latex agglutination test for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Clin Vaccine Immunol. 2011.
  80. Khoo O, Wongtongkam N, Pakmanee N, Omori-Satoh T, Sitprija V. Development of reversed passive latex agglutination for detection of Thai cobra (*Naja kaouthia*) venom. J Nat Toxins. 1999.
  81. Chander R, Batra M, Singh D, Kumar Y, Rawat S, Kumar S. A new in-vitro agglutination technique for potency estimation of antsnake venom serum (ASVS). Toxicon. 2006.
  82. Chinonavanig L, Karnchanachetane C, Pongsettakul P, Ratanabanangkoon K. Diagnosis of snake venoms by a reverse latex agglutination test. Clin Toxicol. 1991;29(4):493–503.
  83. Li3n V, Rojas A, Rodr3guez-Acosta A. Design of an agglutination latex test to detect venoms from Viperidae snakes in patients’ serum. Rev Cubana Med Trop. 2004.
  84. Amaral CFS, Campolina D, Dias MB, Bueno CM, Ch3vez-Olortegui C, Penaforte CL, et al. Time factor in the detection of circulating whole venom and crotoxin and efficacy of antivenom therapy in patients envenomed by *Crotalus durissus*. Toxicon. 1997.

85. Griffin, Caryl; Sutor JSB. *Microparticle Reagent Optimization: A Laboratory Reference Manual from the Authority on Microparticles*. Seradyn, editor. Indianapolis; 1994.
86. WHO - World Health Organization. What is snakebite envenoming? WHO [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 18]; Available from: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>
87. Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. Vol. 39, *Biologicals*. 2011. p. 129–42.
88. Rojas G, Jiménez J, Gutiérrez J. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 1994;32(3):351–63.
89. Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *J Proteomics* [Internet]. 2009;72(2):183–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>.
90. Al-Abdulla I, Garnvwa JM, Rawat S, Smith DS, Landon J, Nasidi A. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*. 2003;42(4):399–404.
91. Habib AG, Warrell DA. Antivenom therapy of carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming: Effectiveness and strategies for delivery in West Africa. *Toxicon*. 2013;69:82–9.
92. Garfin SR, Castilonia RR, Mubarak SJ, Hargens AR, Akeson WH, Russell FE. The effect of antivenin on intramuscular pressure elevations induced by rattlesnake venom. *Toxicon*. 1985;23(4):677–80.
93. Segura Álvaro, Herrera M, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM, León G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals*. 2013;
94. Chippaux J-P, Goyffon M. Production and Use of Snake Antivenin. In [cited 2018 Apr 6]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/b36a/c44f7b956c2aa18c7a80ec78ac41803f7f2b.pdf>
95. Molina Molina DA, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Costal-Oliveira F, Ávila GR de, Soccol VT, et al. Identification of a linear B-cell epitope in the catalytic domain of bothropasin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Mol Immunol*. 2018.
96. Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody production with synthetic peptides. In: *Methods in Molecular Biology*. 2016.



97. Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997.
98. dos Santos PO, Rodrigues AM, Fernandes GF, da Silva SHM, Burger E, de Camargo ZP. Immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* Using a Latex Test: Detection of Specific Antibody Anti-gp43 and Specific Antigen gp43. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(2).
99. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon.* 1998;
100. Li Q, Ownby CL. Evaluation of four different immunogens for the production of snake antivenoms. *Toxicon.* 1992.
101. Dos-Santos MC, Yamaguchi IK, Caricatti CP, Higashi HG, Dias-da-Silva W. Immunization of equines with phospholipase A2 protects against the lethal effects of *C.d. terrificus* venom. *Brazilian J Med Biol Res.* 1989.
102. Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Barbosa RL, Corso G, Boschero AC. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *C.d. terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2000.
103. Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry [Internet].* 1988;27(2):730–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349062>.
104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951.
105. Grodzki AC, Berenstein E. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol Biol.* 2010.
106. Linow F. Spectrophotometry & spectrofluorimetry —a practical approach. Herausgegeben von C. L. Bashford und D. A. Harris. 176 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. IRL Press, Oxford, Washington, DC, 1987.
107. SDS-PAGE L, Sds T. Laemmli buffer Background Purpose of the Laemmli buffer Laemmli Buffer Recipe Preparation Recommended Storage Temperature of Laemmli buffer Laemmli buffer References. *Nature.* 1970;5–6.
108. Motulsky; H.J. GraphPad Statistics Guide. [Internet]. 2020. Available from:

- <http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>.
109. Molina F, Laune D, Gougat C, Pau B, Granier C. Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Pept Res* [Internet]. 1996;9(3):151–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8875595](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8875595).
  110. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. Schrödinger LLC [Internet]. 2014; <http://www.pymol.org>. Available from: <http://www.pymol.org>.
  111. Rédei GP. Blast (basic local alignment search tool). In: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. 2008.
  112. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *J Am Chem Soc*. 1963;85(14):2149.
  113. Gausepohl, H., Boulin, C., Kraft, M., Frank R. Automated multiple peptide synthesis. *Pept Res*. 1992;5(6):315–20.
  114. Merrifield R. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzym Relat Areas Mol Biol* [Internet]. 1969;32:221. Available from: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=AramCV0yCqYC&oi=fnd&pg=PA221&dq=Solid-phase+peptide+synthesis&ots=GQq1DUsqoC&sig=gZV37K0rIUZzuzl7-b9JM4ExXI0>.
  115. Kirby CJ, Gregoriadis G. Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia. *J Microencapsul*. 1984;
  116. Wiegand H. Finney, D. J.: *Probit analysis*. 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge 1971. XV, 333 S., 41 Rechenbeispiele, 20 Diagr., 8 Tab., 231 Lit., L 5.80. *Biom Z*. 1972.
  117. C.-Mendoza CE, Bhatti T, Bhatti AR. Electrophoretic analysis of snake venoms. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1992;580(1–2):355–63.
  118. Hayashi MAF, Nascimento FD, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Pereira A, et al. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon*. 2008;52(3):508–17.
  119. Coronado MA, Gabdulkhakov A, Georgieva D, Sankaran B, Murakami MT, Arni RK, et al. Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2013.
  120. Schrödinger L. The PyMOL molecular graphics system, version 1.8.

- <https://www.pymol.org/citing>. 2015.
121. Peigneur S, Orts DJB, Prieto da Silva AR, Oguiura N, Boni-Mitake M, de Oliveira EB, et al. Crotonamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of kv channels. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2012;82(1):90–6. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.112.078188>.
  122. Kattah LS, Santoro MM, Diniz CR, De Lima ME. Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits 3H-choline uptake in guinea pig ileum. *Brazilian J Med Biol Res*. 2000;33(9):1093–7.
  123. Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *J Mol Biol*. 2011.
  124. Faure G, Gowda VT, Maroun RC. Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A2 by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC Struct Biol* [Internet]. 2007;7(1):82. Available from: <http://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-7-82>.
  125. Lomonte B, Rangel J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*. 2012;60(4):520–30.
  126. Serrano SMT, Mentele R, Sampaio CAM, Fink E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, pa-bj, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1995;34(21):7186–93.
  127. Parry MAA, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: A prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*. 1998;6(9):1195–206.
  128. Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve Growth Factor from Mouse Submaxillary Gland: Amino Acid Sequence. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1971;68(10):2417–20. Available from: [http://www.pnas.org/content/68/10/2417.abstract?ijkey=fd56d588e252929c82126c610480a277c4583b9a&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://www.pnas.org/content/68/10/2417.abstract?ijkey=fd56d588e252929c82126c610480a277c4583b9a&keytype2=tf_ipsecsha)
  129. Cloud PE, Licari GR, Wright LA, Troxel BW. a Nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1969;62(3):623–30. Available from: <http://www.pnas.org/content/62/3/623.abstract%5Cnhttp://www.pnas.org/content/62/3/623.full.pdf%5Cnhttp://www.pnas.org/content/62/3/623.short>.
  130. Kumar S. Nerve growth factor. *Nature*. 1973;244(5416):471.

131. Muniz JRC, Ambrosio ALB, Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Moura-da-Silva AM, Oliva G, et al. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon*. 2008.
132. Xavier Gomis-Rüth F, Meyer EF, Kress LF, Politi V. Structures of adamalysin II with peptidic inhibitors. Implications for the design of tumor necrosis factor  $\alpha$  convertase inhibitors. *Protein Sci*. 2008.
133. Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. In: *Molecular Nutrition and Food Research*. 2006.
134. Brinkhous KM, Read MS, Fricke WA, Wagner RH. Botrocetin (venom coagglutinin): Reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex (platelet aggregation/von Willebrand factor/ristocetin testing). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;
135. Van Regenmortel MHV. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. In: *Biologicals*. 2001.
136. Hancock DC, O'Reilly NJ. Synthetic peptides as antigens for antibody production. *Methods Mol Biol*. 2005.
137. Molina-bol Var JA, Galisteo-gonz Lez F. Comprehensive Review Latex Immunoagglutination Assays \*. *J Macromol Sci* . 2005.
138. Newman DJ, Henneberry H, Price CP. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1992.
139. Lisse JR. Does rheumatoid factor always mean arthritis? *Postgraduate Medicine*. 1993.
140. Bartels EM, Ribel-Madsen S. Cytokine measurements and possible interference from heterophilic antibodies - problems and solutions experienced with rheumatoid factor. *Methods*. 2013.
141. Winder AD, Mora AS, Berry E, Lurain JR. The "hook effect" causing a negative pregnancy test in a patient with an advanced molar pregnancy. *Gynecol Oncol Reports*. 2017.
142. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nature reviews. Disease primers*. 2017.
143. Theakston RDG, Laing GD. Diagnosis of snakebite and the importance of

- immunological tests in venom research. *Toxins*. 2014.
144. Georgieva D, Öhler M, Seifert J, Bergen M Von, Arni RK, Genov N, et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*-correlation with pharmacological activities. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2302–16.
  145. Francischetti IM, Gombarovits ME, Valenzuela JG, Carlini CR, Guimarães J a. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2000;127(1):23–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081410>
  146. Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López JC, Chaves E, et al. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop*. 2002;50(1):337–46.
  147. Boldrini-França J, Corrêa-Netto C, Silva MMS, Rodrigues RS, De La Torre P, Pérez A, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J Proteomics*. 2010;73(9):1758–76.
  148. Cavalcante WLG, Ponce-Soto LA, Marangoni S, Gallacci M. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 2015;96:46–9.
  149. Teixeira-Araújo R, Castanheira P, Brazil-Más L, Pontes F, Leitão de Araújo M, Machado Alves ML, et al. Antivenomics as a tool to improve the neutralizing capacity of the crotalic antivenom: A study with crotamine. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017.
  150. Sörensen BL. Produção de soros anti-peçonhentos e características imunológicas de cada soro. In: Atheneu, editor. *Animais peçonhentos reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos*. Rio de Janeiro/São Paulo; 1990. p. 91–107.
  151. Cardoso DF, Mota I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*. 1997;
  152. Junior RSF, Anderlini RP, Pimenta DC, De Oliveira Orsi R, Barraviera B, Sant’Anna OA. New nanostructured silica adjuvant (SBA-15) employed to produce antivenom in young sheep using *C.d. terrificus* and *Apis mellifera* venoms detoxified by cobalt-60. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2010;
  153. World Health Organization (WHO). Guidelines for the production, control and regulation

- of snake antivenom immunoglobulins. *Biol Aujourdhui*. 2010;
154. Duarte CG, Alvarenga LM, Dias-Lopes C, Machado-de-Ávila RA, Nguyen C, Molina F, et al. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine*. 2010;28:1168–76.
  155. Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* [Internet]. 1992;48(42):9217–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004040200185612X>.
  156. Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Mol Immunol*. 1978.
  157. Finney D. Probit Analysis. Cambridge: Cambridge University Press; 1971. 333 p.
  158. Cardoso JLC, França Fos, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003.
  159. Bérnils RS, Costa HC. Répteis brasileiros: lista de espécies. *Herpetol Bras*. 2015.
  160. Peigneur S, Orts DJB, Prieto da Silva AR, Oguiura N, Boni-Mitake M, de Oliveira EB, et al. Crotonamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. *Mol Pharmacol*. 2012.
  161. T.W. J, R.A. H, H. F-C. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978.
  162. Bon C, Changeux J -P, Jeng T -W, Fraenkel-Conrat H. Postsynaptic Effects of Crotoxin and of Its Isolated Subunits. *Eur J Biochem*. 1979.
  163. Allison AC, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*. 1974;
  164. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Corrigendum to “Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens” [*Vaccine* 30 (13) (2012) 2256-2272]. *Vaccine*. 2012.
  165. Dyson HJ, Wright PE. Antigenic peptides. *FASEB Journal*. 1995.
  166. Harrison R a., Cook D a., Renjifo C, Casewell NR, Currier RB, Wagstaff SC. Research strategies to improve snakebite treatment: Challenges and progress. *J Proteomics*

[Internet]. 2011;74(9):1768–80. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.019>.

167. Bermúdez-Méndez E, Fuglsang-Madsen A, Føns S, Lomonte B, Gutiérrez JM, Laustsen AH. Innovative immunization strategies for antivenom development. *Toxins*. 2018.

## TABLES

**Table 1 - Sets of overlapping pentadecapeptides frame shifted by three residues corresponding to the amino acid sequence of crotamine (Uniprot entry code Q9PWF3). Color intensity in number of pixels from the reaction between peptide and IgG anti-*C. d. terrificus*.**

Entry Q9PWF3	Sequence MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMD CRWRWKCKKGS	
Peptide number	Peptide Sequence	Color intensity in number of pixels
1	MKILYLLFAFLFLAF	26.344
2	LYLLFAFLFLAFLSE	18.642
3	LFAFLFLAFLSEPGN	22.993
4	FLFLAFLSEPGNAYK	38.940
5	LAFLSEPGNAYKQCH	13.536
6	LSEPGNAYKQCHKKG	27.483
7	PGNAYKQCHKKGGHC	23.404
8	AYKQCHKKGGHCFPK	30.026
9	QCHKKGGHCFPKEKI	15.477
10	KGGHCFPKEKICLP	16.371
11	GHPKEKICLPPSS	9.934
<b>12</b>	<b>FPKEKICLPPSSDFG</b>	<b>129.450</b>
<b>13</b>	<b>EKICLPPSSDFGKMD</b>	<b>105.656</b>
<b>14</b>	<b>CLPPSSDFGKMDCRW</b>	<b>92.040</b>
15	PSSDFGKMDCRWRWK	37.079
16	DFGKMDCRWRWKCK	29.748
17	KMDCRWRWKCKKGS	21.444
18	DCRWRWKCKKGS	29.536



**Table 2 - Sets of overlapping pentadecapeptides frame shifted by three residues corresponding to the amino acid sequence of PLA2 (Uniprot entry code P62022). Color intensity in number of pixels from the reaction between peptide and IgG anti-*C. d. terrificus*.**

Entry P62022	Sequence MRALWIVAVLLVGVEGHLLQFNKMIKFETRKNNAIPFYAFYGCYCGWGGRGRPKDATDRCCFVHDCCYGKLAKCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWCEE QICECDRVAECLRRSLSTYKYGYMFYPDSRCRGPSETC							
Peptide number	Peptide Sequence	Color intensity in number of pixels	Peptide number	Peptide Sequence	Color intensity in number of pixels	Peptide number	Peptide Sequence	Color intensity in number of pixels
1	MRALWIVAVLLVGVE	14.079	<b>15</b>	<b>YCGWGGRGRPKDATD</b>	<b>100.404</b>	29	KSGYITCGKGTWCEE	15.887
2	LWIVAVLLVGVEGHL	8.384	<b>16</b>	<b>WGGRGRPKDATDRCC</b>	<b>106.868</b>	30	YITCGKGTWCEEQIC	14.563
3	VAVLLVGVEGHLLQF	13.291	<b>17</b>	<b>RGRPKDATDRCCFVH</b>	<b>83.344</b>	31	CGKGTWCEEQICECD	10.060
<b>4</b>	<b>LLVGVEGHLLQFNKM</b>	<b>58.351</b>	18	PKDATDRCCFVHDCC	17.000	32	GTWCEEQICECDRVA	6.325
<b>5</b>	<b>GVEGHLLQFNKMIKF</b>	<b>59.205</b>	19	ATDRCCFVHDCCYGK	24.272	33	CEEQICECDRVAEAC	9.556
<b>6</b>	<b>GHLLQFNKMIKFETR</b>	<b>54.411</b>	20	RCCFVHDCCYGKLAK	22.755	34	QICECDRVAECLRR	37.616
7	LQFNKMIKFETRKNA	28.682	21	FVHDCCYGKLAKCNT	19.179	35	ECDRVAECLRRSLS	43.364
8	NKMIKFETRKNNAIPF	22.874	22	DCCYGKLAKCNTKWD	11.861	36	RVAECLRRSLSTYK	30.046
9	IKFETRKNNAIPFYAF	33.258	23	YGKLAKCNTKWDIYP	16.477	37	AECLRRSLSTYKYGY	26.033
10	ETRKNNAIPFYAFYGC	27.649	24	LAKCNTKWDIYPYSL	8.126	38	LRRSLSTYKYGYMFY	21.404
11	KNAIPFYAFYGCYCG	9.993	25	CNTKWDIYPYSLKSG	10.788	39	SLSTYKYGYMFYPDS	66.834
12	IPFYAFYGCYCGWGG	14.079	26	KWDIYPYSLKSGYIT	18.927	<b>40</b>	<b>TYKYGYMFYPDSRCR</b>	<b>89.291</b>
13	YAFYGCYCGWGGRGR	44.510	27	IYPYSLKSGYITCGK	33.106	<b>41</b>	<b>YGYMFYPDSRCRGPS</b>	<b>96.132</b>
14	YGCYCGWGGRGRPKD	71.550	28	YSLKSGYITCGKGTW	21.483	<b>42</b>	<b>MFYPDSRCRGPSETC</b>	<b>128.291</b>

**Table 3 – Peptides characteristics. Sets of peptides with 21 residues.** Column 1 refers to the name of each peptide, column 2 name of source protein, column 3 code Uniprot, column 4 number corresponding to the spot on the membrane, column 4 peptide sequence, column 5 molecular weight (WM) and column 6 isoelectric point (IP).

Peptide name	Protein	Code	Spot number	Sequence	WM	PI
Crotam1	Crotamine	Q9PW3	12,13 e 14	F <sup>12</sup> PKEKICLPPSSDFGKMDCRW <sup>32</sup>	2484,93	8.03
Ctx2	Crotoxin B	P62022	4,5 e 6	L <sup>10</sup> LVGVEGHLLQFNKMIKFETR <sup>30</sup>	2472,97	8.6
Ctx3	Crotoxin B	P62022	15,16 e 17	Y <sup>43</sup> CGWGGRGRPKDATDRCCFVH <sup>63</sup>	2384,69	8.68
Ctx4	Crotoxin B	P62022	40,41 e 42	T <sup>118</sup> YKYGYMFYPDSRCRGPSETC <sup>138</sup>	2524,82	7.69

**Table 4. Neutralization of lethal activity of *C.d. terrificus* venom in mice by antipeptide serum.** Each mouse received intraperitoneally (i.p.) 0.2 mL of a solution containing 7 DL 50 (14 µg) of *C.d. terrificus* in PBS, mixed with 100 µL of anti-peptides (dilution 1:2) from Rabbit 2, 3 or 4; 50 µL of antipeptides (dilution 1:4) from Rabbit 2, 3 or 4, or 200 µL of control. The survival rate was measured during 48 h after injection.

	TIME (h)				
	0	12	24	36	48
	<b>Survival%</b> (survival/total)				
PBS	100 (6/6)	33 (2/6)	16 (1/6)	16 (1/6)	16 (1/6)
Control	100 (12/12)	25 (3/12)	0 (0/12)	0 (0/12)	0 (0/12)
Antipeptides diluted 1:4 (Rabbit 2)	100 (12/12)	8 (1/12)	8 (1/12)	8 (1/12)	8 (1/12)
Antipeptides diluted 1:4 (Rabbit 3)	100 (6/6)	33 (2/6)	33 (2/6)	33 (2/6)	33 (2/6)
Antipeptides diluted 1:4 (Rabbit 4)	100 (6/6)	16 (1/6)	16 (1/6)	16 (1/6)	16 (1/6)
Antipeptides diluted 1:2 (Rabbit 2)	100 (12/12)	17 (2/12)	8 (1/12)	8 (1/12)	8 (1/12)
Antipeptides diluted 1:2 (Rabbit 3)	100 (6/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)
Antipeptides diluted 1:2 (Rabbit 4)	100 (6/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)	50 (3/6)

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 Reactivity of 15-mer overlapping peptides derived from the amino acid sequence of crotamine from the *C.d. terrificus* venom.** The membrane was probed with non-immune IgG (35 µg/mL) (A) or anti-*C.d. terrificus* IgG (35 µg/mL) (B). The binding of anti-*C.d. terrificus* was detected by a phosphatase alkaline anti-horse diluted 1:3000. (C) The three-dimensional structure of crotamine (PDB Code 4GV5) is represented in ribbons using the color code to represent the sequence FP<sup>13</sup>KEKICLPPSSDFGKMDCR<sup>32</sup>W, named Crotam1. In orange the location of linear epitope and in blue Arg 31 and Trp 32 residues.

**Figure 2 Reactivity of 15-mer overlapping peptides derived from the amino acid sequence of PLA2 from the *C.d. terrificus* venom.** The membrane was probed with non-immune IgG (35 µg/mL) (A) or anti-*C.d. terrificus* IgG (35 µg/mL) (B). The binding of horse anti-*C.d. terrificus* was detected by a phosphatase alkaline anti-horse diluted 1:3000. (C) The three-dimensional structure of crotoxin B (PDB Code 2QOG) is represented in ribbons (C): In green, the sequence LLVGVEGH<sup>17</sup>LLQFNKMIKFETR with histidine 17 in blue, named Ctx2, in red the sequence Y<sup>43</sup>CG<sup>45</sup>WG<sup>47</sup>GRGRPKDATDRCCFVH, named Ctx3 with Tyrosine 43, Glycine 45 and 47 in blue, and in magenta the sequence. TYKYGYMFYPDSRCRG<sup>133</sup>PSETC with glycine in blue.

**Figure 3 Indirect ELISA binding between *C.d. terrificus* venom, crotamine, crotoxin and antibodies.** (A) A microplate was coated with 5 µg/mL venom of *C. t. durissus*, crotamine, crotoxin and assayed with immunopurified anti-crotalus antibodies (2.5 µg/mL), antipeptides and control antibodies, both diluted 1:100. The dots represent mean ± standard deviation of absorbance at 490 nm. The binding capacity of the antipeptides to the *C.d. terrificus* venom, and crotoxin are significantly higher than those of the antibodies present in control (\*p < 0.05) and (\*\*p < 0.01), respectively. (B) A microplate was coated with 10 µg/mL of peptides

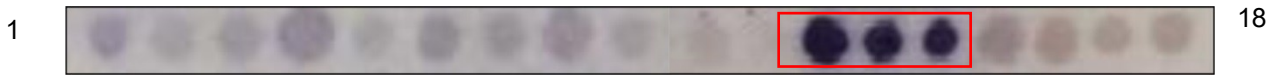
Crotam1, Ctx2, Ctx3 or Ctx4 and assayed with anti-peptides diluted from 1:100 until 1:3200. The binding capacity of the anti-peptides diluted 1:100 to the peptide Crotox 2, Crotox 3 and Crotox 4, are significantly higher than control (\*\*p < 0.001). Error bars represent mean  $\pm$  standard error of absorbance at 490 nm.

## FIGURES

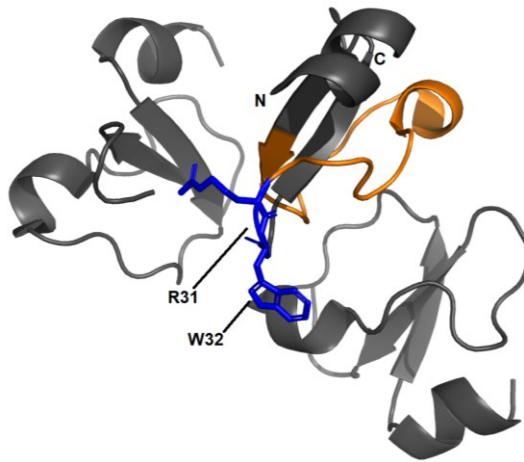
1A



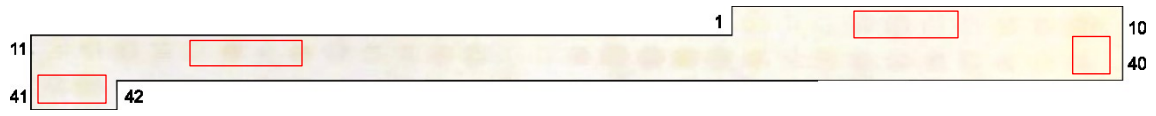
12B



1C



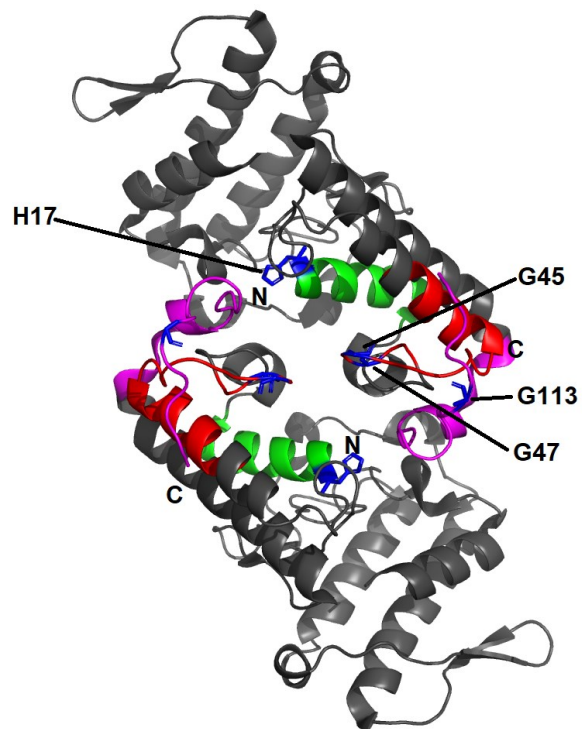
2A



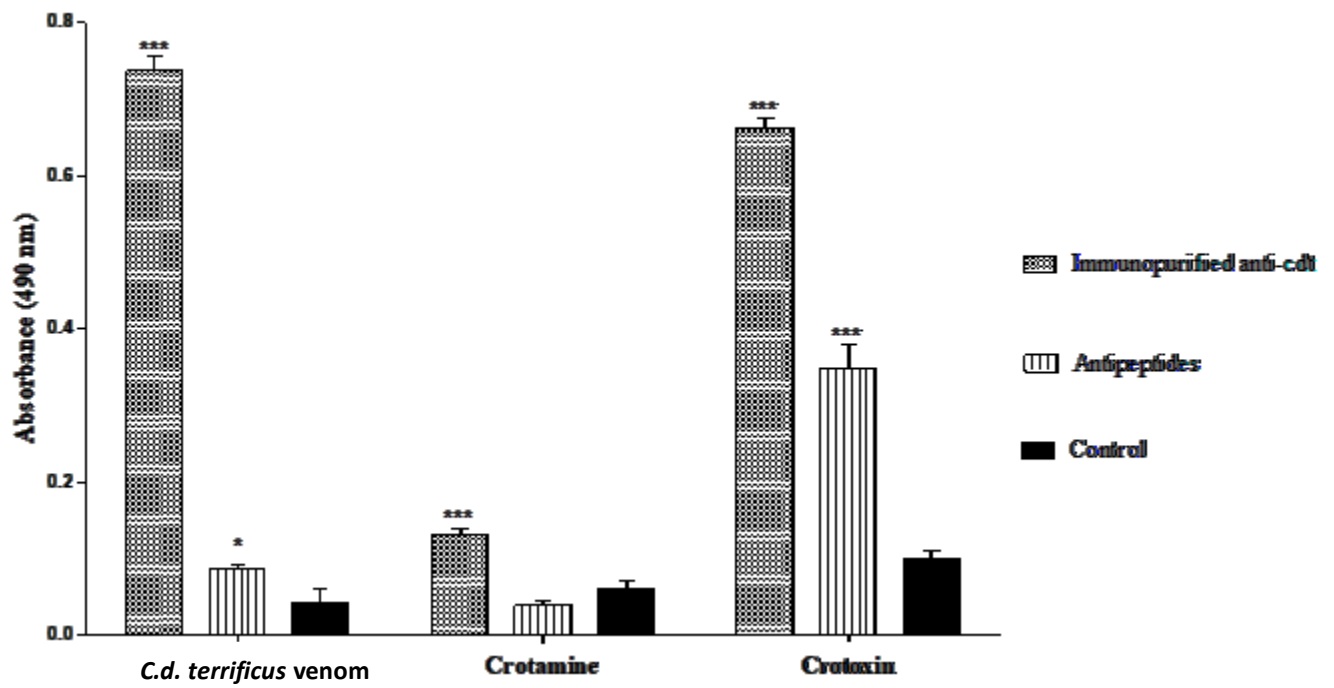
2B



2C



3A



3B

