



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

MAPEAMENTO E SÍNTESE DE EPITOPOS DA MUTALISINA II (LHF-II)
METALOPROTEINASE PURIFICADA DO VENENO DE *Lachesis muta muta*.

Rodrigo Novaes Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui

Belo Horizonte
2005

Rodrigo Novaes Ferreira

MAPEAMENTO E SÍNTESE DE EPITOPOS DA MUTALISINA II (LHF-II)
METALOPROTEINASE PURIFICADA DO VENENO DE *Lachesis muta muta*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2005

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica de Toxinas e Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com o auxílio das seguintes instituições:

- ✿ CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- ✿ FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.
- ✿ INSERM – Institute National de la Sante et de la Recherche Médicale, França.

“Devemos julgar um homem mais pelas suas perguntas que pelas suas respostas”.

Voltaire.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que com muita luta, amor e carinho guiaram-me no caminho do bem.

Agradeço a minha amada esposa Melissa pelo carinho, paciência e compreensão nesta jornada.

Agradeço ao meu irmão Gustavo, sua esposa Maria Carmem pelas noites de buraco. E a Regina, pelo apoio nesta etapa.

Agradeço ao Professor Carlos Chávez Olórtegui, pela oportunidade dada em seu laboratório e por me trilhar na vida científica.

Agradeço ao Professor Carlos Alberto e ao Prof. Tomáz por me acolherem em seu laboratório.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pelo suporte e apoio.

Agradeço ao Biólogo Jamil pela ajuda, companheirismo e disposição para ajudar – sem você nada seria possível.

Agradeço aos membros do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Fundação Ezequiel Dias pela ajuda nos ensaios de inibição da mutalísina II.

Agradeço ao Núcleo de Biomoléculas pela ajuda na purificação e análise dos peptídeos utilizados neste trabalho.

Agradeço ao Dr. Andrez e Mário, pela ajuda na síntese e análise dos peptídeos; Liza e Larissa, pela ajuda nas imunizações; Juliana pela consultoria técnica; Paula Castanheira e Paula Henriques pelo apoio nas horas escuras.

Agradeço aos colegas de laboratório: Adriana, Christina, Eduardo, Francisca, Kádma, Priscila e Priscila.

Agradeço aos meus amigos do CS:S e de bases, pelos bons momentos vividos nestes dois anos.

INDICE

RESUMO.

ABSTRACT.

LISTA DE FIGURAS.

LISTA DE GRÁFICOS.

LISTA DE TABELAS.

LISTA DE ABREVIATURAS.

1 – INTRODUÇÃO.

1.1 – Serpentes.

1.2 – serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

1.3 – Dentição.

1.4 – Distribuição geográfica e caracterização das famílias de serpentes brasileiras de importância médica.

1.5 – Ofidismo: um caso de saúde pública.

1.6 – *Lachesis muta muta*.

1.7 – Componentes bioquímicos presentes no veneno de *L. muta muta*.

1.8 – Fator Hemorrágico Laquéético (LHF).

2 – OBJETIVOS.

2.1 – Objetivos gerais.

2.2 – Objetivos específicos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 – Animais e mutalisina II.

3.2 – Produção de anticorpos antimutalisina II.

3.3 – Produção de anticorpos anti-peptídeos carregados ao KLH.

3.4 – Síntese de peptídeos ligados à membrana de celulose (SPOT-síntese).

- 3.5 – Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana.
- 3.6 – Regeneração da membrana.
- 3.7 – Síntese dos peptídeos selecionados em fase sólida (SPPS).
- 3.8 – Purificação dos peptídeos selecionados.
- 3.9 – Acoplamento dos peptídeos selecionados ao KLH.
- 3.10 – ELISA para titular o reconhecimento dos peptídeos selecionados pelo soro antimutalisina II.
- 3.11 – ELISA para titular anticorpos antipeptídeos.
- 3.12 – Purificação de IgG antipeptídeos por afinidade.
- 3.13 – Ensaio de inibição da mutalisina II.
- 3.14 – SDS-PAGE do complexo inibidor – mutalisina II.

4 – RESULTADOS.

- 4.1 – Produção de anticorpos antimutalisina II.
- 4.2 – Mapeamento de epitopos da mutalisina II.
 - 4.2.1 – Síntese de peptídeos lineares em membrana de celulose.
 - 4.2.2 – Localização dos epitopos da mutalisina II na membrana de celulose.
- 4.3 – Seleção dos peptídeos antigênicos e sua localização na estrutura tridimensional da mutalisina II.
- 4.4 – Síntese química dos epitopos selecionados pelo método de SPOT-síntese.
- 4.5 – Reconhecimento dos peptídeos sintetizados pelo soro de coelho antimutalisina II.
- 4.6 – Reatividade dos anticorpos antipeptídeos.
- 4.7 – Estequiometria de inibição da mutalisina II.
- 4.8 – SDS-PAGE do complexo inibidor – mutalisina II.

5 – DISCUSSÃO.

6 – CONCLUSÕES.

7 – PERSPECTIVAS.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Resumo

Temos utilizado a técnica de SPOT-síntese para construir peptídeos lineares (doze resíduos de aminoácidos com sobreposição de nove) sobre uma superfície de celulose cobrindo toda seqüência primária de aminoácidos da mutalisina II, uma metaloproteinase responsável pela atividade hemorrágica do veneno de *Lachesis muta muta* (Viperidae). Soro de coelho antimutalisina II ao reagirem com estes peptídeos revelaram três principais regiões imunogênicas: uma C-terminal, Central e N-terminal da proteína. Uma seqüência peptídica de cada região imunogênica identificada foi selecionada para a síntese química. Os peptídeos foram purificados e analisados por espectrometria de massas. Estes peptídeos foram reconhecidos pelo soro de coelho antimutalisina II em um ensaio de ELISA. Os peptídeos foram acoplados ao KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) para a produção de anticorpos antipeptídeos em coelho. Estes anticorpos reconheceram moderadamente a mutalisina II e fracamente o veneno total. Foi purificada a fração IgG do soro de coelho antipeptídeos para utilização em ensaio de inibição desta enzima. Estes anticorpos foram capazes de neutralizar a atividade proteolítica da enzima em 63,5%.

ABSTRACT

SPOT - synthesis technique has been used to construct immobilized linear peptides (twelve amino acids residues overlapping nine residues) over cellulose surface covering the entire primary amino acid sequence of mutalysin II, a metalloproteinase responsible for hemorrhagic activity of *Lachesis muta muta* venom. Rabbit serum against mutalysin II reacted with these peptides and revealed three major immunogenic regions: a C-terminal, a Central and N-terminal of the protein. A peptide sequence of each identified immunogenic region was selected for its chemical synthesis. The peptides were purified and analyzed by mass spectroscopy and these peptides were recognized by rabbit serum against mutalysin II in an ELISA assay. The peptides were coupled to KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) for the production of anti-peptides antibodies in rabbit. These antibodies had a mild recognition of mutalysin II and a weak recognition of the whole venom. The IgG fraction of the rabbit serum anti-peptides was purified for an inhibition assay of this enzyme. These antibodies were capable to inhibit the proteolytic activity of the enzyme by 63,5%.

Lista de Figuras

Figura 1 - Critérios de identificação entre serpentes peçonhentas e não-peçonhentas.

Figura 2 - Dentição de serpentes.

Figura 3 - Serpente *Lachesis muta muta*.

Figura 4 - Seqüência de aminoácidos da metaloproteinase mutalisina II e dos peptídeos ligados à membrana de celulose produzidos pelo método de SPOT-síntese.

Figura 5 - Reatividade do soro de coelho antimutalisina II sobre a membrana de celulose contendo os peptídeos da LHF-II.

Figura 6 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos da mutalisina II e de metaloproteinases hemorrágicas e não hemorrágicas de venenos de serpentes.

Figura 7 - Possível estrutura tridimensional da mutalisina II e localização espacial dos determinantes antigênicos selecionados por SPOT-síntese.

Figura 8 – Inibição da atividade proteolítica da mutalisina II por anticorpos antipeptídeos..

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas do Brasil, 1990 – 1993.

Gráfico 2 - Letalidade dos acidentes ofídicos por região fisiográfica do Brasil, 1990 a 1993.

Gráfico 3 - Titulação dos anticorpos antimutalisina II por ELISA.

Gráfico 4 – Perfil de purificação do produto bruto da síntese do peptídeo nº 4 (VVADHGMFTKYN-C) e análise por espectrometria de massa.

Gráfico 5 – Perfil de purificação do produto bruto da síntese do peptídeo nº 25 (LKTFGEWRERVLC) e análise por espectrometria de massa.

Gráfico 6 – Perfil de purificação do produto bruto da síntese do peptídeo nº 57 (SEGPSYEFSDCS-C) e análise por espectrometria de massa.

Gráfico 7 - Reconhecimento dos peptídeos sintetizados individualmente e carregados ao KLH pelo soro de coelho antimutalisina II.

Gráfico 8 - Reatividade dos anticorpos antipeptídeos carregados ao KLH.

Gráfico 9 - Estequiometria de inibição da mutalisina II pela IgG antimutalisina II e antipeptídeos .

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Coeficiente de incidência anual (por 100.000 habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica do Brasil, 1990 a 1993.

Tabela 2 - Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvido, Brasil 1990 – 1993.

Tabela 3 - Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente brasileira, 1990 – 1993.

Tabela 4 - Seqüência de aminoácidos dos peptídeos lineares reativos ao soro de coelho antimutalisina II e seus resíduos críticos.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP – Bromo – 4 – Chloro – 3 - Indolyl Phosphate Mono Toluidinium Salt.

CBS – Citrate buffered saline.

°C - Graus centígrados.

Da – Daltons.

DIPC – Diisopropilcabodiimida.

DMF – Dimetil formamida.

ELISA – Enzime linked Immunosorbent Assay.

Fmoc – Fluorenilmetiloxicarbonila.

HOBt – Hidroxibenzotriazole.

HPLC – Cromatografia liquida de alta performance.

IgG – Imunoglobulina G.

kDa – Quilodaltos.

KLH – Keyhole limpet hemocyanin.

M – Molar.

MBS – Maleimido benzoyl-N-hidroxysuccinamida.

mg – Miligrama.

mL – Mililitro.

mM – Milimolar.

MTT – (3-[4,5- Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide).

OPD – Ortofenilenodiamino.

PBS – Tampão salina fosfato.

SPPS – Síntese de peptídeos em fase sólida.

TBS – Salina 0,8%, KCl 0,002M, Tris 0,05M.

T-TBS – TBS, contendo Tween-20.

µg – Microgramas.

µl – Microlitros.

Scavengers – Reagentes usados na solução de clivagem para proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos de grupos reativos gerados na síntese.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Serpentes.

Serpentes são animais vertebrados pertencentes ao grupo dos répteis. Seu corpo é recoberto por escamas, conferindo-lhes um aspecto ora brilhante ora opaco, apresentando uma certa aspereza quando tocadas. As serpentes, como outros répteis, não conseguem controlar a temperatura de seu corpo, por isso são chamados de animais ectotérmicos. Isso implica que ao tato elas pareçam frias, pois sua temperatura é muito próxima à do ambiente em que elas se encontram.

Segundo a Organização Mundial de Saúde existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, sendo que 10 a 14% são consideradas peçonhentas (PINHO, 2001). Estes animais apresentam-se em tamanhos variados que vão desde espécies escavadoras, que se alimentam de cupins e crescem até 10 centímetros, a grandes constritoras, com quase 10 metros de comprimento (POUGH, 1999). Atualmente as serpentes conhecidas estão espalhadas pelos cinco continentes, ilhas e mares, desde a linha do equador até próximo dos círculos polares, aumentando gradativamente o número de espécies nas regiões tropicais.

Didaticamente, as serpentes podem ser classificadas em dois grupos básicos: as peçonhentas, isto é, aquelas que conseguem inocular seu veneno no corpo de uma presa ou vítima, e as não peçonhentas.

1.2 – Serpentes peçonhentas e não-peçonhentas.

Alguns critérios são utilizados para a identificação, a uma distância segura no campo, de serpentes peçonhentas ou não e são mostrados na figura 1. O primeiro deles é a presença de um orifício entre o olho e a narina da serpente, denominado Fosseta Loreal. É possível dizer que, no Brasil, toda aquela que possui esse orifício é considerada peçonhenta. A fosseta Loreal é utilizada para perceber a presença de calor (termorrecepção), o que permite à serpente caçar no escuro presas que emitam calor de seus corpos, tais como pequenos mamíferos e aves. A única serpente brasileira que é peçonhenta e não possui Fosseta Loreal é a cobra-coral verdadeira (gênero *micrurus*).

Outra característica importante na distinção das serpentes peçonhentas é o tipo de terminação de sua cauda. Algumas serpentes apresentam, além da Fosseta Loreal, um chocalho na ponta da cauda, que emite um som característico de alerta quando a serpente é perturbada. Essas serpentes são conhecidas como cascavéis (gênero *Crotalus*). As cascavéis são facilmente encontradas em áreas abertas e secas, mesmo nas áreas de cultivo agrícola de grande parte do Brasil, excetuando-se as áreas de vegetação mais densa.

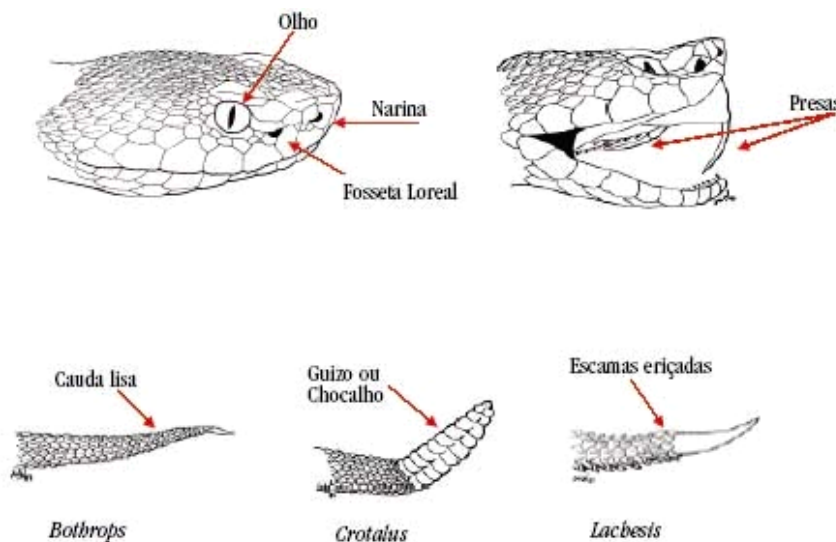


Figura 1 – Critérios de identificação entre serpentes peçonhentas e não-peçonhentas. Modificado de FUNASA 2001.

Algumas serpentes apresentam a extremidade da cauda com as escamas eriçadas lembrando uma escova. Essas são as chamadas surucucus ou pico-de-jaca (gênero *Lachesis*), nome dado em virtude do aspecto da pele do animal se parecer muito com a fruta. Estas são encontradas apenas em áreas de floresta tropical densa, como na Floresta Amazônia e no pouco que resta da Mata Atlântica.

Outras serpentes possuem apenas como indicativo de serem peçonhentas a Fosseta Loreal. Isto se deve pelo fato da terminação de sua cauda ser toda lisa. Estas serpentes pertencem à família das jararacas (gênero *Bothrops*). As jararacas podem ser encontradas, em sua grande maioria, em áreas mais limitadas de matas, apesar de alguns tipos habitarem também zonas de caatinga e cerrado.

1.3 – Dentição.

Outro aspecto utilizado para distinguir serpentes peçonhentas de não-peçonhentas é o tipo de dentição. No grupo das serpentes peçonhentas existem dois tipos de dentição. Um, onde o par de dentes que injeta o veneno é dianteiro, fixo, pequeno e semi-canalizado e pouco se destaca dos demais dentes maciços e menores. Este tipo é denominado *dentição proteróglifa*. No outro, os dentes fixos são menores e em pequeno número, destacando-se os que injetam o veneno, que são longos, dianteiros, completamente canalizados, (semelhantes a uma agulha hipodérmica), curvados para trás quando a serpente está com a boca fechada e movendo-se para frente no momento em que ela desfere o bote. Esta última é denominada *dentição solenóglifa*.

No grupo das não-peçonhentas, dois tipos básicos de dentição também podem ser observados. Quando o animal possui muitos dentes fixos, pequenos e maciços, esta recebe o nome de *dentição áglifa*; em outro tipo além desses dentes fixos, pequenos e maciços, observa-se ao fundo da boca um par de dentes mais longos que penetram na presa quando esta é mordida, esta dentição é chamada *dentição opistóglifa*.

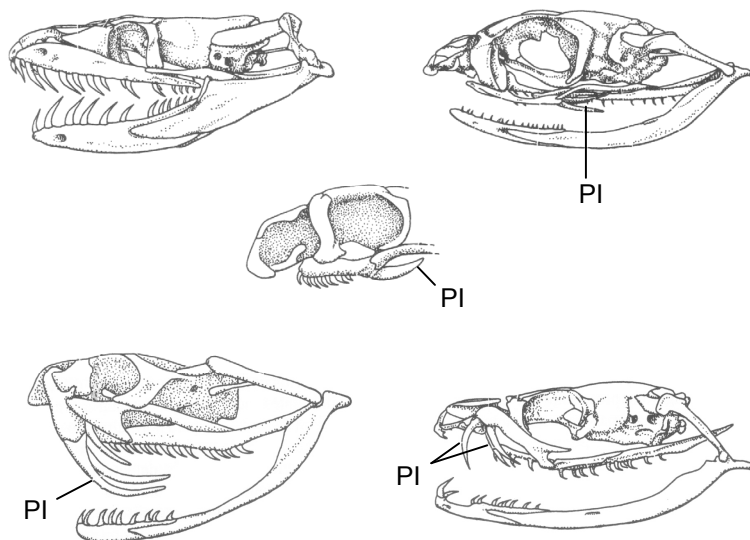


Figura 2 – Dentição de serpentes. PI = presa inoculadora. (a) Áglifa (sem presa inoculadora); (b, c) Opistóglifa (presas inoculadoras na porção posterior do maxilar); (d) Solenóglifas (presas inoculadoras sobre um maxilar giratório); (e) Proteróglifa (presas inoculadoras permanentemente eretas na porção anterior do maxilar). Modificado de POUGH, 1999.

1.4 – Distribuição geográfica e caracterização das famílias de serpentes brasileiras de importância médica.

No Brasil existem aproximadamente 250 espécies de serpentes distribuídas em todo território nacional, sendo que destas, 70 são peçonhentas. A maioria destes acidentes deve-se a serpentes pertencentes a quatro famílias, que englobam os gêneros: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu e outros), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu, surucutinga) e *Micrurus* (coral).

É de grande importância, tanto médica quanto ecológica, que as serpentes de uma região, peçonhentas ou não, de uma região, sejam reconhecidas e identificadas de forma a auxiliar no rápido e preciso tratamento soroterápico das vítimas desse tipo de acidente e para conhecimento da fauna ofídica local.

Família Viperidae

Gênero: *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Porthidium*)

Corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país, pois é responsável por cerca de 90% dos envenenamentos (FUNASA, 2001). Este gênero compreende cerca de 30 espécies, distribuídas desde o extremo Norte até o Sul do território nacional. São conhecidas popularmente por: jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, caiçara entre outras denominações.

Estas serpentes habitam as 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). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Apresentam cabeça triangular, fosseta loreal e cauda lisa. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído.

Seu veneno tem ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. Os sintomas são caracterizados pela dor e edema endurecido no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Equimoses e sangramentos no

ponto da picada são freqüentes. Infartamento ganglionar e bolhas podem aparecer na evolução, acompanhados ou não de necrose (FUNASA, 2001).

Gênero: *Crotalus*

É responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões. Apresenta o maior coeficiente de letalidade devido à freqüência com que evolui para insuficiência renal aguda (FUNASA, 2001). O gênero agrupa várias subespécies, pertencentes à espécie *Crotalus durissus*. Popularmente são conhecidas por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá e outras denominações populares. São encontradas desde o Paraná até o Piauí em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e raramente na faixa litorânea. Não ocorrem na Floresta Amazônica e no Pantanal. Não são agressivas e, quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho.

As principais ações do veneno de cascavel: neurotóxica, miotóxica e coagulante. As manifestações clínicas são pouco importantes no acidente crotálico apresentando um quadro local pouco expressivo sem dor. Há parestesia local ou regional que pode persistir por tempo variável, podendo ser acompanhada de edema discreto ou eritema no ponto da picada. Pode ocorrer também mialgia generalizada, podendo haver evolução para insuficiência renal aguda, causa maior de óbito neste grupo (FUNASA, 2001).

Gênero: *Lachesis*

Por se tratar de serpentes encontradas no interior da Floresta Amazônica, onde a densidade populacional é baixa, o sistema de notificação não é tão eficiente e as informações disponíveis sobre esse tipo de acidente são escassas (FUNASA, 2001).

O veneno tem três tipos principais de ações: proteolítica, coagulante, hemorrágica (FUNASA, 2001). Os envenenamentos humanos por esta sub-espécie, embora infreqüentes, são sempre severos devido ao tamanho da serpente e à quantidade de veneno injetada em uma única picada. Estes acidentes têm por característica um

pronunciado dano tecidual local e alterações sistêmicas como hemorragia, hipotensão, coagulopatias insuficiência renal e choque cardiovascular. Outros sintomas como bradicardia, diarreia e vômito também foram descritos. Pouco se sabe sobre a patogênese das alterações locais e sistêmicas produzidas por este veneno (RUCAVADO, 1998).

Família Elapidae

Gênero: *Micrurus*

Corresponde a 0,4% dos acidentes com serpentes peçonhentas registrados no Brasil (FUNASA, 2001). Esta serpente está presente desde o sul da Bahia, Região Central até o Sul do Brasil. Mais conhecida como cobra coral, a *Micrurus* tem hábito subterrâneo vivendo sob o folhicho, troncos em decomposição, entre raízes e pedras. Não é agressiva, não dá bote e oferece perigo somente quando manuseada. Sua presa de veneno é fixa e pequena localizada na parte anterior da boca, por isso ela morde ao invés de picar.

O seu veneno tem como principal característica a ação neurotóxica. Os constituintes tóxicos do veneno são denominados neurotoxinas (NTXs) de ação pré-sináptica e pós-sináptica (FUNASA, 2001).

1.5 – Ofidismo: um caso de saúde pública

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbidade e mortalidade que estes resultam. A Organização Mundial de Saúde estima que, no mundo, ocorram de 1.250.000 a 1.665.000 acidentes com serpentes peçonhentas por ano com o número de óbitos girando em torno de 30.000 a 40.000 mortes (PINHO, 2001).

Segundo dados notificados à Fundação Nacional de Saúde, ocorreram no Brasil, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, 81.611 acidentes ofídicos, o que representa uma média de 20.000 casos/ano para o país (FUNASA 2001). A maioria das notificações procedeu das regiões Sudeste e Sul, as mais populosas do país e que contam com melhor organização de serviços de saúde e sistema de informação.

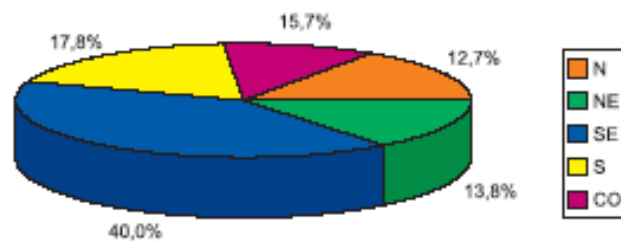


Gráfico 1. Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas do Brasil, 1990 – 1993 (FUNASA, 2001).

Nos 81.611 casos notificados no período, o coeficiente de incidência para o Brasil foi de aproximadamente 13,5 acidentes /100 mil habitantes, com a região Centro-Oeste contribuindo com o maior índice do país (33 acidentes/100 mil habitantes), seguido pela região Norte (24 acidentes/100 mil habitantes), Sul (16 acidentes/100 mil habitantes), Sudeste (13 acidentes/100 mil habitantes), deixando para o Nordeste o título de menor índice (7 acidentes/100 mil habitantes) (FUNASA, 2001). Nas regiões Norte, ainda que apresentando um alto coeficiente, e a região Nordeste podem ocorrer subnotificação tendo em vista a dificuldade ao acesso aos serviços de saúde.

Região	Coef.90	Coef.91	Coef.92	Coef.93
Brasil	13,78	13,30	14,08	13,94
Norte	24,44	23,23	23,77	25,89
Nordeste	6,77	6,71	6,23	7,65
Centro-Oeste	34,75	28,36	37,98	32,13
Sudeste	13,15	13,24	12,92	12,34
Sul	15,35	15,11	17,52	16,83

Tabela 1 – Coeficiente de incidência anual (por 100.000 habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica do Brasil, 1990 a 1993 (FUNASA, 2001).

A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos e ao aumento da atividade humana nos trabalhos no campo. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, observa-se incremento do número de acidentes no período de Setembro a Março. Na região Nordeste, os acidentes aumentam de Janeiro a Maio, enquanto que, na região Norte, não se observa sazonalidade marcante, ocorrendo os acidentes uniformemente durante todo o ano (FUNASA, 2001). Em 52,3% das notificações, a idade dos acidentados variou de 15 a 49 anos, onde se concentra a principal faixa etária de força de trabalho do país. O sexo masculino foi acometido em 70% dos acidentes enquanto o feminino em 20% deles (FUNASA, 2001).

Em 16,34% das 81.611 notificações analisadas, o gênero da serpente não foi informado. Nos 65.911 casos de acidentes por serpente peçonhenta, quando o animal foi identificado, a distribuição dos acidentes, de acordo com o gênero da serpente envolvida, pode ser observada na tabela 2.

Distribuição	nº acidentes	%
<i>Bothrops</i>	59.619	73,1
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2
<i>Lachesis</i>	939	1,1
<i>Micrurus</i>	281	0,3
Não informados	13.339	16,3
Não peçonhentos	2.361	3,0

Tabela 2 – Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvido, Brasil 1990 – 1993 (FUNASA, 2001).

Dos 81.611 casos notificados, houve registro de 359 óbitos. Excluindo-se os 2.361 casos informados como não-peçonhentos, a letalidade geral para o Brasil foi de 0,45%. O maior índice foi observado nos acidentes com serpentes do gênero *Crotalus*, onde em 5.072 acidentes ocorreram 95 óbitos (1,87%).

Gênero	n° Casos	n° Óbitos	Letalidade (%)
<i>Bothrops</i>	59.619	185	0,31
<i>Crotalus</i>	5.072	95	1,87
<i>Lachesis</i>	939	9	0,95
<i>Micrurus</i>	281	1	0,36
Não informado	13.339	69	0,52
Total	79.250	359	0,45

Tabela 3 – Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente brasileira, 1990 – 1993 (FUNASA, 2001).

A letalidade do acidente ofídico não se mostra uniforme nas regiões fisiográficas, como se observa no gráfico 2. O maior índice foi registrado no Nordeste, apesar desta região apresentar o menor coeficiente de incidência do país.

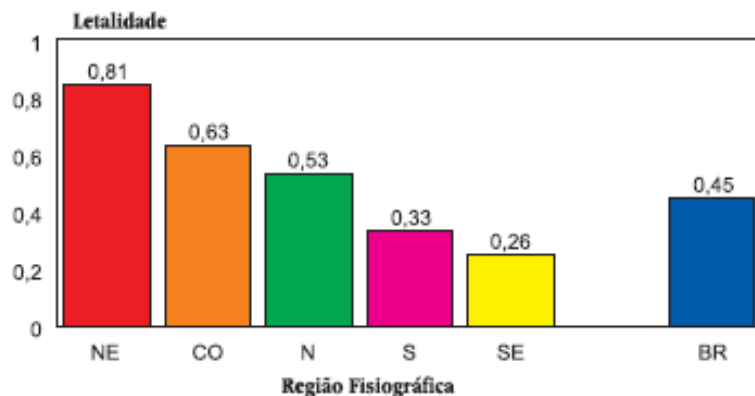


Gráfico 2 – Letalidade dos acidentes ofídicos por região fisiográfica do Brasil, 1990 a 1993 (FUNASA, 2001).

1.6 – *Lachesis muta muta*

O gênero *Lachesis* (família Viperidae, sub-família: Crotalinae) inclui somente uma espécie, a *L. muta* (Linnaeus, 1766), distribuída nas Américas Central e do Sul, da Nicarágua ao Brasil. Desta única espécie, quatro subespécies são normalmente reconhecidas: *L. m. stenophrys*, distribuída na costa atlântica da Nicarágua, Costa Rica e Panamá e em algumas áreas da costa do Pacífico na Colômbia; *L. m. melanocephala*, restrita a região da costa do Pacífico ao sul da Costa Rica; *L. m. muta*, distribuídas nas florestas tropicais da Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Peru, Equador e Brasil; e *L. m. rhombeata* confinada a áreas de mata Atlântica no Brasil (OTERO, 1998).

A serpente *Lachesis muta muta*, também conhecida popularmente como surucucu, é o maior Crotalídeo brasileiro e uma das maiores cobras peçonhentas do mundo, podendo medir até 4,5m de comprimento. A surucucu vive na mata densa e úmida, em tocas de pedra ou em galerias de animais silvestres. Possuem hábitos noturnos e alimenta-se principalmente de pequenos mamíferos. Ao contrário de outros crotalídeos, a fêmea é ovípara e seus ovos possuem um período de incubação de 76 a 79 dias (FUNASA, 2001).

Suas presas inoculadoras de veneno ultrapassam 3cm de comprimento. Tem um comportamento agressivo e o seu bote pode ultrapassar 3m de extensão com no mínimo 1m de altura (FUNASA, 2001).



Figura 3 – Serpente *Lachesis muta muta*.

1.7 – Componentes bioquímicos do veneno de *L. muta muta*

Os venenos das serpentes contêm componentes que servem não só para imobilizar a presa, mas também para facilitar a digestão. O veneno é uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas com mais de 90% do peso seco do veneno sendo composto de polipeptídeos, incluindo enzimas, toxinas e pequenos peptídeos. Restos de tecido insolúveis também são freqüentemente notados em venenos extraídos em cativeiro. Os constituintes inorgânicos dos venenos incluem: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co, e Zn. O papel biológico de cada metal não está claro, entretanto, é provável que alguns deles, como o Ca, Mg e Mn, sejam importantes para a estabilização de certas proteínas do veneno, enquanto outras, em particular, Zn, Cu, Fé e Co, possam ser participantes nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos do veneno, como de metaloproteinases (BJARNASON, 1994).

O veneno da maioria das espécies de serpentes venenosas contém vários componentes tóxicos, que juntos podem atuar sinergicamente o que individualmente pode apresentar um efeito predominante em vítimas humanas ou animais experimentais (SANCHEZ, 2003). A maioria do veneno bruto é composta de componentes protéicos. Os outros compostos incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (primariamente fosfolipídios), aminas biogênicas (particularmente abundante nos venenos de Viperídeos e Crotalídeos), nucleotídeos e aminoácidos (BJARNASON, 1994).

A serpente *Lachesis muta muta* desenvolveu um notável veneno com variadas atividades, como a hemorrágica, proteolítica e coagulante. A atividade proteolítica tem como principais sintomas lesões locais como edema, bolhas e necrose. Esta ação do veneno possui patogênese complexa e é resultado da atividade de proteases, hialuronidases e fosfolipases, assim como a liberação de mediadores de resposta inflamatória, a ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação coagulante do veneno. (SANCHEZ, 1991).

A manifestação de dano tecidual no local da picada, como a hemorragia, está entre os mais dramáticos e pronunciados efeitos do envenenamento por *L. muta muta* (BJARNASON, 1994).

Na literatura há relatos de sangramento persistente nas marcas da mordida, sangramento do intestino (SILVA HAAD, 1980), equimose local (TORRES et al., 1995), epistaxe e hematúria (OTERO PATINO et al., 1993). Bolaños et al. (1982) sugeriu que o sangramento espontâneo em envenenamentos por *L. muta muta* são menos comuns que nos acidentes botrópicos, embora também tenham sido relatado os sintomas relacionados acima pelos outros autores.

A ação coagulante do veneno de *L. muta muta* foi descrita por Silveira et al. (1989) e Yarleque et al. (1989) a partir da caracterização de uma fração de veneno com atividade tipo trombina (enzimas thrombin-like) que convertem fibrinogênio em fibrina. Esta ação produz distúrbios o sistema de coagulação, caracterizados pelo consumo de seus fatores ocasionando em uma potenciação da ação hemorrágica do veneno.

Sintomas neurotóxicos distintos foram relatados por Silva Haad (1980), Bolaños et al. (1982), Bard et al. (1994), Torres et al. (1995) e Jorge et al. (1996) em envenenamentos por *L. muta muta*. O surgimento de náuseas, cólica abdominal, hipotensão, bradicardia, hipersalivação, sudorese, distúrbios respiratórios, repetidas ocorrências de vômito, diarreia e sintomas de choque ocorridos em períodos de tempo que variam de 15 a 90 minutos após o acidente. Sanchez e colaboradores relataram a purificação de fatores do veneno de *L. muta muta* capazes de ativar o plasminogênio e provocar a liberação de cininas.

1.8 – Metaloproteinases dos venenos de serpentes (SVMP).

A atividade hemorrágica dos venenos de serpentes é atribuída à presença de metaloproteinases (SVMPs). As metaloproteinases zinco dependentes são componentes importantes e estão presentes em altas concentrações nos venenos de serpentes da família viperidae (BJARNASON, 1994). As SVMPs são responsáveis pelas conspícuas hemorragias associadas aos acidentes com serpentes da família viperidae.

Estes fatores apresentam ação em diversos componentes do sistema hemostático e fibrinolítico. O mecanismo de hemorragia induzida por metaloproteinases do veneno não parece depender da degradação disseminada de componentes da matriz extracelular, mas provavelmente da hidrólise de sítios altamente específicos e ainda indefinidos na lâmina basal dos capilares, que é responsável pela sua integridade (OHSAKA et al. 1973; BJARNASON, 1994). A clivagem de proteínas da membrana basal com conseqüente enfraquecimento da estrutura dos capilares constitui o principal mecanismo pelo qual estas enzimas provocam hemorragia (GUTIERREZ, 2000).

Elas são encontradas em diferentes estados de processamento como precursores zimogênicos: as SVMPs da subfamília P-I contém apenas o domínio catalítico, enquanto a subfamília P-III os domínios desintegrin-like / cysteine-rich são adicionados ao domínio catalítico (FOX AND LONG, 1998).

O domínio catalítico das SVMPs compartilham grande similaridade estrutural e funcional com os domínios de outras metaloproteinases (TANJONI, 2003). Muitas destas enzimas têm um alto grau de conservação dos resíduos envolvidos na ligação do átomo de zinco catalítico, apresentando o motivo (HEXXH) ou este mesmo motivo de forma mais complexa (HEXXHXXGXXH) (STOCKER, 1995). Deste modo, Stocker e colaboradores sugeriram o nome “metzincinas” para estas enzimas, fazendo uma alusão ao motivo conservado com um átomo de zinco e um resíduo de metionina, muito conservado, localizado no assoalho do sítio catalítico que forma uma *met-turn*.

1.9 – Fatores Hemorrágicos Laquéticos (LHFs)

Previamente, Sanchez e colaboradores (1987, 1991) reportaram o isolamento de dois fatores hemorrágicos do veneno de *L. muta muta*, chamados de mutalisina I e II. As toxinas hemorrágicas no veneno deste crotalídeo foram caracterizadas como sendo metaloproteases (zinco endopeptidases) (SANCHEZ, 2000) e o veneno de surucucu contém duas classes destas toxinas hemorrágicas, que são diferenciadas pelo seu peso molecular.

O primeiro fator hemorrágico, mutalisina I é uma glicoproteína de massa 100 kDa, com duas subunidades e ponto isoelétrico de 4.7. Ela é agrupada com as toxinas hemorrágicas de classe IV membros da subfamília das reprotisinas (SANCHEZ, 2003). Este fator apresenta uma elevada ação hemorrágica, com cerca de 39 vezes mais atividade específica do que a observada no veneno bruto de onde foi purificado, e uma baixa atividade proteolítica (SANCHEZ, 1995).

O segundo fator hemorrágico, mutalisina II, é uma zinco metaloproteinase de cadeia única, apresentando 1 mol de zinco e dois moles de cálcio por mol de proteína e 200 resíduos de aminoácidos, cuja extremidade amino terminal é bloqueada por um resíduo de glutamina ciclizada. Apresenta massa molecular de 22.5 kDa, ausência de glicosilações e ponto isoelétrico de 6.6 (SANCHEZ, 2003). Baseando-se em seu domínio estrutural, esta enzima está agrupada na metaloproteinases de classe P1, membro da família das reprotisinas de metzincinas (BJARNASON, 1994; STOCKER, 1995; SANCHEZ, 2003).

A mutalisina II apresenta baixa atividade hemorrágica e alta atividade proteolítica sobre vários substratos, o que está de acordo com relatos de outras pequenas metaloproteinases (BJARNASON, 1994). Testes *in vivo* e *in vitro* realizados por Rucavado (1999) demonstraram que uma quantidade significativa de mutalisina II é necessária para induzir uma hemorragia evidente.

Esta metaloproteinase hidrolisa os componentes da matriz extracelular, induz a síntese e ativação de metaloproteinases da matriz que podem participar de sua degradação e induzir o edema (RUCAVADO, 1999). Este fator hemorrágico possui atividade proteolítica sobre diversos substratos, como a caseína, dimetilcaseína,

fibrinogênio e fibrina. Ela não induz a formação de coágulo, mas hidrolisa seletivamente a cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio, deixando inalteradas as cadeias $B\beta$ e $\gamma\text{-}\gamma$ (SANCHEZ, 1991). Esta enzima também degrada laminina, fibrinectina, colágeno do tipo IV e induz mionecrose moderada (RUCAVADO, 1999).

A atividade hemorrágica, bem como a proteolítica, é inibida por quelantes (EDTA, EGTA). Os inibidores de serinoproteases (PMSF) não têm efeito sobre este fator hemorrágico. Esta enzima tem a sua atividade em 50% em presença de Cálcio e é inibida em até 90% em presença de Zinco (SANCHEZ, 1991).

Em 2003 Sanchez e colaboradores relataram a purificação de duas isoformas da mutalisina II (IIa e IIb) purificadas do veneno de *L. muta muta*. As duas isoformas apresentavam notáveis similaridades em suas propriedades físicas, bioquímicas e imunológicas.

No presente momento, o único tratamento específico recomendado pela Organização Mundial de Saúde para o envenenamento por venenos de serpentes é o uso do soro antiofídico (THEAKSON, 2002). Este é obtido de cavalos imunizados com veneno total utilizando adjuvante de Freund (completo e incompleto) ou hidróxido de alumínio, em alguns casos. Os anticorpos do cavalo são digeridos com pepsina e os fragmentos $F(ab')_2$ são purificados e usados como antivenenos. Este produto contém fragmentos $F(ab')_2$ irrelevantes, que requerem o uso de grandes quantidades de antiveneno para neutralizar os efeitos do veneno (CALDERON-ARANDA, 1999). Portanto, seria vantajoso de antígenos que consistem principalmente de epitopos específicos neutralizantes de modo a produzir soros mais específicos e mais eficientes (CALDERON-ARANDA, 1996).

Em 2001, Souza e colaboradores relataram a produção de um anticorpo anti-mutalisina-II produzido em coelhos imunizados com mutalisina II capaz de neutralizar sua atividade proteolítica. Este mesmo anticorpo policlonal também foi capaz de neutralizar 50% da atividade proteolítica do veneno bruto de *Lachesis muta muta*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Bothrops alternatus* e *B. atrox*.

Estevão-Costa et al. (2001) produziram um anticorpo monoclonal em camundongos imunizados com veneno total de *L. muta muta*. Este anticorpo monoclonal, chamado de mAb B₂D₄, foi testado para avaliar a sua reatividade cruzada e capacidade

de neutralizar a atividade hemorrágica de venenos de várias serpentes do gênero *Bothrops*. O mAb B₂D₄, não somente apresentou uma forte reação cruzada com os venenos de *Bothrops alternatus*, *B. atrox*, *B. itapetiningae* and *L. muta. muta* como também foi capaz de neutralizar a atividade hemorrágica da mutalisina-II e destes venenos. Este mAb, no entanto, não apresentou reatividade alguma com o veneno de *Micrurus frontalis* ou *Crotalus durissus terrificus* que, sabidamente, não apresentam atividade hemorrágica.

Com base nestes relatos, a mutalisina-II pode ser considerada um antígeno importante com grande potencial para a preparação de antivenenos direcionados para a soroterapia e até mesmo para a vacinação. O grande empecilho é a toxicidade desta proteína e a dificuldade de obtenção do veneno de *L. muta muta* e a sua purificação.

Tendo em vista este problema o presente trabalho tem por objetivo o mapeamento, caracterização e a produção de epitopos lineares sintéticos da metaloprotease mutalisina II, com a tentativa de produzir anticorpos neutralizantes desta enzima. A produção destes epitopos pode auxiliar no tratamento, ou até, na prevenção da atividade hemorrágica em acidentes laquéticos e botrópicos.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

Mapear, caracterizar e sintetizar epitopos lineares da metaloproteinase mutalisina II purificada do veneno de *L. muta muta* na tentativa de produzir anticorpos neutralizantes contra esta toxina.

2.2 – Objetivos específicos

- Produzir peptídeos lineares sintéticos ligados à membrana (SPOT síntese) para seleção dos melhores determinantes antigênicos.
- Produzir peptídeos sintéticos solúveis a partir das melhores seqüências selecionadas por SPOT síntese.
- Produzir anticorpos neutralizantes contra os peptídeos sintéticos obtidos a partir do mapeamento da mutalisina II.
- Caracterizar a resposta imune após a imunização com os peptídeos sintéticos.
- Realizar ensaios de inibição da mutalisina II com os anticorpos produzidos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais e Mutalisina II.

Dois coelhos da raça New Zealand pesando 2 Kg foram utilizados para o programa de imunização. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e receberam água e alimentação em condições controladas.

A enzima mutalisina II purificada foi gentilmente cedida pelo Doutor Eládio Sanchez do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

3.2 – Preparação dos anticorpos antimutalisina II.

Anticorpos antimutalisina II foram produzidos em coelho. Após a coleta do soro pré-imune, o coelho recebeu em cinco pontos de seu dorso, inicialmente, uma injeção subcutânea de mutalisina II (200 μ g em 1,0mL de PBS, pH 7.4) emulsificada em 1,0mL de adjuvante completo de Freund. Mais três doses de reforço (200 μ g em 1,0mL de PBS, pH 7.4) em 1,0mL de adjuvante incompleto de Freund foram administradas com vinte e um, quatorze e sete dias depois da primeira injeção. Uma semana após a última injeção o coelho foi sangrado e o soro utilizado para os ensaios.

A fração IgG do soro hiperimune de coelho foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A sepharose, segundo Ey et al., 1978.

3.3 – Preparação de anticorpos anti-peptídeos carregados ao KLH.

Anticorpos anti-peptídeos carregados ao KLH foram produzidos em coelho. Após a coleta do soro pré-imune, o coelho recebeu uma injeção inicial de peptídeos carregados (500µg em 1,0mL de PBS, pH 7.4) emulsificada em 1,0mL de adjuvante completo de Freund e a emulsão foi injetada subcutaneamente em cinco pontos no dorso do coelho. Mais três doses de reforço (500µg em 1,0mL de PBS, pH 7.4) em 1,0mL de adjuvante incompleto de Freund foram administradas com vinte e um, quatorze e sete dias depois da primeira injeção. Uma semana após a última injeção o coelho foi sangrado e o soro utilizado para os ensaios.

3.4 – Síntese de peptídeos ligados à membrana de celulose (método Spot-síntese).

A síntese paralela de peptídeos sobre membrana de celulose é uma técnica que permite a construção rápida de um grande número de peptídeos (816 por síntese ou ciclo), em pontos, ou spots, delimitados por volume de deposição de cada aminoácido. Os aminoácidos são depositados em volume mínimo (0,6 µl) com auxílio de um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto como descrito por FRANK, 2002. A síntese múltipla é realizada em um sintetizador e o plano de distribuição dos aminoácidos, bem como a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos são definidos em um programa de computação (MOLINA et al, 1996).

A síntese dos spots ocorre da seguinte forma: os grupos hidroxilas livres sobre a membrana de celulose servem de ponto de ancoragem para a síntese do peptídeo. Estes grupos são acoplados através de ligação estável com 8 a 10 unidades de polietilenoglicol, com o objetivo de afastar o peptídeo do suporte e conferir melhor estabilidade na ligação do peptídeo à membrana. A síntese do peptídeo inicia-se sempre pelo *C-terminal* do último aminoácido da seqüência estabelecida. Após a desproteção do aminoácido, ligado a um grupo protetor Fmoc, pela adição de 20% de piperidina em DMF, as funções aminas são recuperadas e podem ser visualizadas pela coloração azul com bromofenol.

Os aminoácidos são, em seguida, ativados por DIPC/HOBT (150µl em DMF para cada aminoácido) e depositados para reinício de outro ciclo, sendo que estes ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. As funções NH₂ livres ou que não reagiram, são acetiladas utilizando-se anidrido acético 10% em DMF para evitar a formação de peptídeos errados ou outras ligações indesejáveis. O grupo protetor Fmoc do próximo aminoácido é novamente retirado verificado sempre o desbloqueio pela coloração com azul de bromofenol. Efetuam-se lavagens da membrana com metanol e após secagem ao ar fresco, esta membrana é posicionada no sintetizador para outro ciclo. O acompanhamento se faz necessário durante todo o processo para verificar se a síntese está sendo efetuada corretamente. Cada etapa constitui um ciclo da síntese,

durando em média 1 h e 15 min. Este ciclo se repete quantas vezes forem necessário para se obter o peptídeo desejado.

Nesta metodologia, o tamanho do peptídeo sintetizado é limitado em 15-20 resíduos de aminoácido, pois há dúvidas quanto à qualidade de ligação dos aminoácidos em peptídeos muito alongados.

Ao final da síntese, os grupos laterais dos aminoácidos são desprotegidos pela adição de TFA associado a DCM e trietilsilano, e assim somente as cadeias peptídicas restam fixadas de maneira covalente sobre a membrana de celulose.

A membrana com os diversos peptídeos sintetizados pode ser analisada por ensaios imunológicos e estes podem ser reproduzidos em torno de 30-40 vezes utilizando-se a mesma membrana, para anticorpos policlonais e até 70 vezes para anticorpos monoclonais. Portanto, esta metodologia vem sendo empregada em diversos estudos de identificação de determinantes antigênicos nas estruturas protéicas, e predições de estruturas funcionais nestas moléculas.

3.5 – Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana.

A membrana contendo os peptídeos sintéticos é lavada três vezes, com TBS (Salina, KCl 0.002M, Tris 0,05M) pH 7.4, e incubadas posteriormente com solução de bloqueio (GENOSIS, SU-07-250A) em TBS, contendo Tween-20 a 0,05% (T-TBS) e sacarose a 0.5%, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana é lavada e incubada com o soro teste por 90 min a 37°C.

Após novas lavagens, o conjugado (anticorpos conjugados com fosfatase alcalina) é adicionado e mantido sob agitação por 90 minutos. Após duas lavagens com T-TBS e mais duas com CBS pH 7,0 por 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente, é adicionando o substrato para fosfatase (MTT-BCIP, Sigma) por 30 minutos. A reação é parada com duas lavagens da membrana com CBS pH 7,0.

A reação pode ser visualizada pela presença de um precipitado azul sobre os peptídeos mais reativos. A intensidade da cor foi calculada usando uma escala arbitrária, onde o ponto mais escuro obtido obteve o valor de 100 e o mais claro o valor de 0.

3.6 – Regeneração da membrana.

Ao final do ensaio imunológico, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração para sua posterior utilização. A membrana foi seqüencialmente tratadas com DMF, reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de β -mercaptoetanol), reagente B (etanol / água / ácido acético na proporção de 50:40:10 vol / vol / vol), seguido de três lavagens de 10 min com metanol, para a remoção dos complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos.

3.7 – Síntese química dos peptídeos selecionados em fase sólida (Fmoc).

Após a seleção das seqüências peptídicas pelo método de SPOT, os peptídeos selecionados foram sintetizados utilizando-se um protocolo de síntese química que utiliza aminoácidos com o grupamento amina protegido por um grupamento Fmoc e a cadeia lateral protegida por outros grupamentos.

Para a técnica de SPPS foi utilizado a estratégia (Fmoc)/*tert*-butyl (*t*Bu) (CARPINO, 1972) com os grupos protetores de cadeia lateral mais comuns: *tert*-butyl éter (*t*Bu) para serina, treonina e Tirosina; *tert*-butyl ester (*Ot*Bu) para glutamato e aspartato; benzyloxycarbonyl (Boc) para lisina e triptofano; trityl (Trt) para glutamina, asparagina, histidina e cisteína; 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) para arginina.

O protocolo foi realizado de acordo com Merryfield (1969) com as seguintes modificações:

- Foram utilizados 55mg de resina (*Rink Amide*) e esta foi colocada no tubo de síntese coberta com 10ml de DMF e deixada em repouso por 30 minutos. Em seguida o grupamento Fmoc foi retirado usando uma solução de piperidina 20% em DMF por 5 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes para expor o grupamento amino presente na resina. O desbloqueio foi confirmado pelo teste de Kaiser.

- Após o desbloqueio, a resina foi lavada três vezes com DMF e ficou pronta para receber o primeiro aminoácido da seqüência (sempre começando do C-terminal do peptídeo).

- O aminoácido foi adicionado em uma quantidade equivalente a quatro vezes em excesso em relação à resina. O aminoácido se liga pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amino da resina, formando uma ligação peptídica. Juntamente com o aminoácido foi adicionado 21.6mg de HOBt e 25µL de DIPC. Estes dois reagentes favorecem a ativação da função COOH do aminoácido, o que facilita a ligação peptídica. Foi colocado DMF suficiente para cobrir toda a resina e o tubo ficou sob agitação por 3 horas.

- Após o tempo de acoplamento, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado

com auxílio de uma bomba a vácuo. A resina foi lavada com DMF por três vezes e o acoplamento foi confirmado pelo teste de Kaiser. Novamente se fez necessário o desbloqueio do grupo N-terminal para o acoplamento do próximo aminoácido.

- O processo de elongação do peptídeo continuou até que o último aminoácido foi acoplado. Após o término do último ciclo, o último aminoácido foi desprotegido, com a retirada do grupo Fmoc, e a resina com o peptídeo foi lavada quatro vezes por cinco minutos com DCM.

- O peptídeo foi desligado da resina com o uso de uma solução de clivagem contendo 2,5% de trietilsilano + 2,5% de etanoditiol + 2,5% de água em um volume final de 5mL de TFA. O tubo de reação ficou agitando com esta solução durante 3 horas.

- Passado às três horas, a solução peptídica foi retirada do tubo de síntese com o auxílio de uma bomba a vácuo. Foi adicionado éter à -10°C à solução peptídica, em seguida, a solução resultante foi armazenada overnight 4°C a fim de precipitar o peptídeo.

- A solução contendo o peptídeo foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O pellet peptídico foi ressuscitado em água Milli-q e liofilizado.

3.8 – Purificação dos peptídeos selecionados.

Os peptídeos (2mg) foram purificados em HPLC de fase reversa utilizando uma coluna Shimadzu-C18 acoplada a sistema de HPLC (Äkta Explorer, Amersham Pharmacia Biotech). O sistema de solventes utilizados foi: solução A, TFA 1,1% em água; e solução B, 1,1% de TFA em acetonitrila. Cada peptídeo foi eluído em um gradiente linear que variou entre 0 e 100% de solvente B em 120 minutos em um fluxo de 1mL/min. Os maiores picos obtidos foram submetidos à espectrometria de massas para análise do produtos sintetizados.

Amostras dos peptídeos foram analisadas em um espectrômetro de massa do tipo electrospray-quadrupolo-TOF (ESI-Q-TOF Micro) da Micromass, a um fluxo de 5-10 μ L/min. A fonte de ionização foi operada de forma positiva.

3.9 – Acoplamento dos peptídeos selecionados ao KLH.

Nesta etapa do trabalho selecionamos a proteína KLH como proteína carreadora para a produção dos anticorpos anti-peptídeos. Os peptídeos selecionados foram acoplados ao KLH, seguindo o protocolo:

Cinco miligramas de KLH foram pesados e dissolvidos em 0,5ml de PBS 50mM pH 7.4. Em seguida foi acrescentado 65µl de uma solução de MBS 15mg/ml diluída em acetonitrila. Essa mistura permaneceu sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Para separação do KLH que não foi ativado pelo MBS foi utilizada uma coluna de filtração molecular (Sephadex G-10), equilibrada com PBS 50mM, pH 6.0. Foram coletadas 20 frações de 600µl e verificada a sua absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm.

Foi feito um "pool" do primeiro pico e a este foi acrescentada à solução contendo 2mg dos peptídeos selecionados diluídos em 0,5ml de PBS.

Esta solução ficou sob agitação durante quatro horas à temperatura ambiente. A solução foi alíquotada e estocada no freezer -20°C em tubos de 1ml protegidos de luz (envoltos com papel alumínio), até seu posterior uso como imunógenos.

3.10 – ELISA de titulação do reconhecimento dos peptídeos selecionados pelo soro antimutalisina II.

Microplacas de ELISA, marca Falcon (Becton Dickinson Labware Oxnard, Canada) com 96 poços, foram sensibilizadas *over night* 4°C com 1µg dos peptídeos em PBS, pH 7.4. A placa foi lavada com solução de lavagem (0,05% Tween-salina) e bloqueada com solução de caseína 2% em PBS 0,05 M + 0,015M NaCl, pH 7.4.

O primeiro anticorpo usado foi o soro de coelho imunizado com mutalisina II, diluído em tampão de incubação (PBS 0,25% de caseína 0,05% tween 20) de 1:50. Para a visualização da ligação dos anticorpos, foi adicionado anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) 1:2000.

O ensaio foi revelado usando uma solução de 2mg OPD em 10ml de tampão citrato pH 5,2 na presença de 2µl de água oxigenada. Após 15 minutos de incubação no escuro a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20.

A absorbância foi verificada em um leitor de ELISA (SpetraMax, Molecular Devices) no comprimento de onda de 492nm.

3.11 – ELISA de titulação dos anticorpos anti-peptídeos.

Microplacas de ELISA, marca Falcon (Becton Dickinson Labware Oxnard, Canada) com 96 poços, foram sensibilizadas *over night* 4°C com 1µg da enzima mutalisina II em tampão bicarbonato de sódio 0,02M, pH 9.6. A placa foi lavada com solução de lavagem (0,05% Tween-salina) e bloqueada com solução de caseína 2% em PBS 0,05 M + 0,015M NaCl, pH 7.4.

O primeiro anticorpo usado foi o soro de coelho imunizado com peptídeos carregados ao KLH, diluído em tampão de incubação (PBS 0,25% de caseína 0,05% tween 20) de 1:50. Para a visualização da ligação dos anticorpos, foram adicionados anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) 1:2000.

O ensaio foi revelado usando uma solução de 2mg OPD em 10ml de tampão citrato pH 5,2 na presença de 2µl de água oxigenada. Após 15 minutos de incubação no escuro a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20.

A absorbância foi verificada em um leitor de ELISA (SpetraMax, Molecular Devices) no comprimento de onda de 492nm.

3.12 – Ensaio de inibição da mutalisina II.

A IgG de coelho antimutalisina II, antipeptídeos e anti-KLH foram comparadas em sua habilidade de inibir a digestão do substrato dimetilcaseína pela mutalisina II. Crescentes quantidades de IgG (1 μ g, 2 μ g, 4 μ g e 6 μ g) foram pré-incubadas antes do ensaio com uma concentração fixa de 0,3 μ g da enzima ativa por 15 minutos à 37°C em 200 μ L de tampão HEPES 50mM contendo 0,154 M NaCl, 25mM CaCl₂, pH 7,4. A proporção molar de inibidor/ enzima foi de 0,46:1, 0,92:1, 1,84:1 e 2,76:1.

O ensaio de hidrólise da dimetilcaseína (LIN et al., 1969) prosseguiu segundo o protocolo:

Os tubos de reação foram preparados com 250 μ L de uma solução de dimetilcaseína 0,2% em tampão HEPES 50mM contendo 0,154 M NaCl, 25mM CaCl₂, pH 7,4. Os incubados foram adicionados aos tubos com dimetilcaseína, em um volume final de 500 μ L, e incubados por 30 minutos à 37°C. A reação foi interrompida com a imersão dos tubos em água fervendo (98°C) por 5 minutos. Aos tubos foram adicionados 250 μ L de TNBS e 250 μ L de tampão bicarbonato de sódio 4%, pH 8,3 e estes foram novamente incubados por 30 minutos à 50°C. Ao final do tempo de incubação foram adicionados 250 μ L de SDS 10% e 125 μ L de uma solução de HCl 1N a cada tubo. A reação foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm relativo ao branco (todos os componentes do ensaio exceto a enzima)

3.14 – SDS-PAGE do complexo mutalisina II – IgG anti-peptídeos.

Uma concentração fixa (0,3µg) de mutalisina II ativa foi pré-incubada com concentrações crescentes de IgG de coelho anti-peptídeos foram pré-incubadas por 15 minutos à 37°C nas mesmas condições do item anterior.

Após o período de incubação da IgG - enzima, uma alíquota de 100µL de uma solução 3mg/mL de fibrinogênio (Sigma) foi adicionada aos tubos e incubados por 15 minutos à 37°C. Depois deste período de incubação, 50µL foram retirados e misturados com 50µL de solução desnaturante e mantidos *over night* à temperatura ambiente.

As amostras foram aplicadas em um gel SDS-PAGE de concentração 4% e separação 12% conforme descrito por Laemmli (1970). Ao final da eletroforese, o gel foi corado com comassie brilliant blue 0,25% em etanol/ ácido acético/ água (1:2:6) e descorado com a mesma solução sem o comassie.

4 – Resultados

4.1 – Produção de anticorpos antimutalisina II.

A mutalisina II pura foi utilizada como imunógeno em coelho a fim de se obter anticorpos antimutalisina II, como descrito em material e métodos.

Pelo ensaio de ELISA indireta (gráfico 3) foi verificado que os anticorpos antimutalisina II foram capazes de reconhecer a enzima pura (-o-) e também a enzima presente no veneno total (-□-). Foi utilizada neste ensaio outra enzima purificada do veneno de *Lachesis muta muta* (*L.m.muta* thrombin-like enzyme – *L.m.muta* TLE) como controle negativo (-▲-).

Demonstrado que os anticorpos antimutalisina II reconheciam a enzima, estes foram usados para o mapeamento das regiões imunodominantes desta proteína.

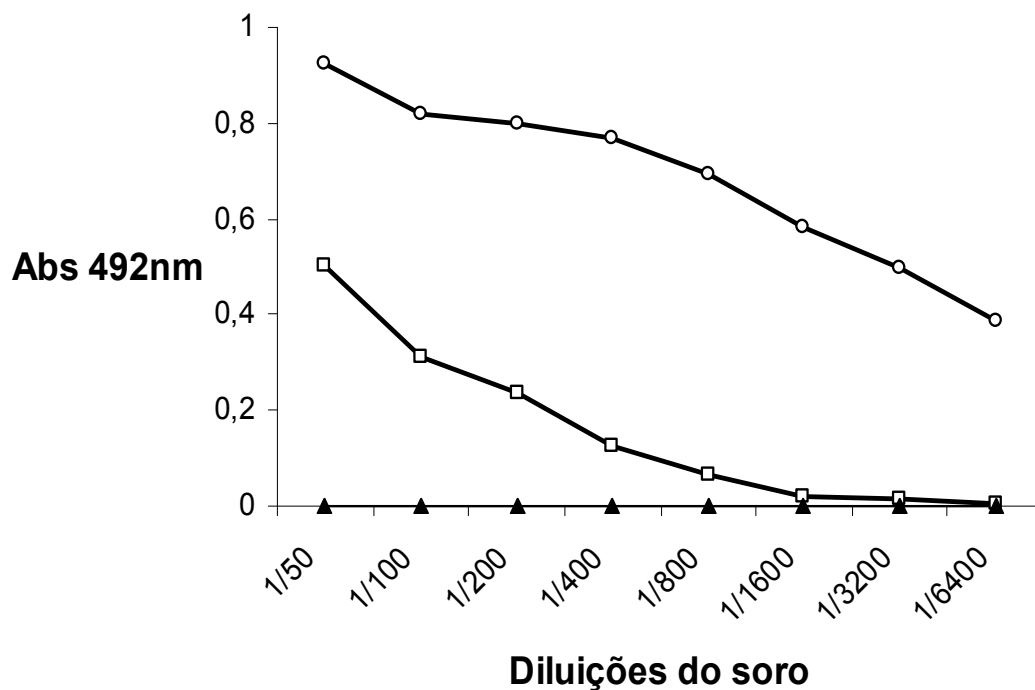


Gráfico 3 – Reatividade dos anticorpos antimutalisina II. A placa foi sensibilizada com 0,5µg/poço. Mutalisina II (-o-), veneno total de *L. muta muta* (-□-) e TLE (-▲-). Conjugado anticoelho HRP 1:2000. A reação prosseguiu como descrito em material e métodos.

4.2.2 – Localização das regiões imunodominantes da mutalisina II em membrana de celulose.

Os peptídeos lineares mais imunogênicos presentes na proteína foram localizados em membrana de celulose utilizando-se o soro de coelho contendo os anticorpos antimutalisina II. A figura 5 mostra a ligação dos anticorpos presentes no soro de coelho antimutalisina II com os peptídeos lineares derivados da mutalisina II.

Para uma melhor caracterização das regiões imunodominantes da molécula, foram considerados como epitopos relevantes para o reconhecimento da molécula os spots cujo valor atribuído estava entre 90 – 100. Estabelecido uma faixa de reconhecimento pôde-se observar a nítida distinção de três regiões principais na molécula: região N-terminal (3, 4, 5, 8 e 9); região Central (25 e 26); e região C-terminal (56, 57 e 58).

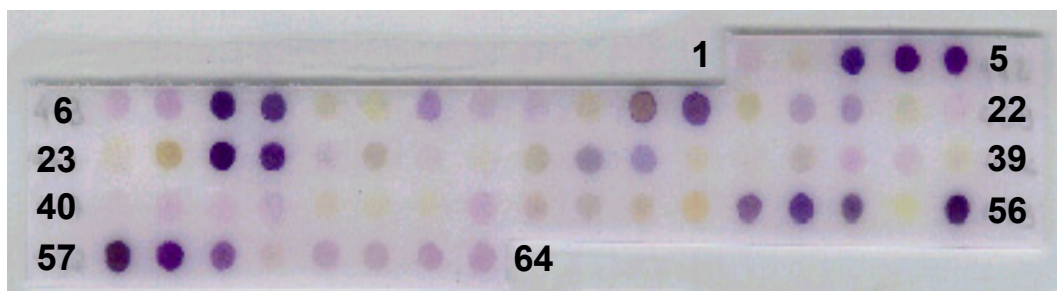


Figura 5 – Reatividade do soro de coelho antimutalisina II sobre a membrana de celulose contendo os peptídeos da mutalisina II. O soro de coelho foi usado na diluição de 1:200 e o ensaio foi realizado como descrito em material e métodos. Os números representam os spots adjacentes.

4.3 – Seleção dos peptídeos antigênicos e sua localização na estrutura 3D da mutalisina II.

Após a identificação das regiões imunodominantes presentes na mutalisina II, foi feita a análise das seqüências dos peptídeos presentes nestas regiões, como mostra a tabela 4.

Região: N-terminal	
Número do Peptídeo	Seqüência
3	E L V V V A D H G M F T
4	V V A D H G M F T K Y N
5	D H G M F T K Y N G N L
8	G N L N T I R T R V H E
9	N T I R T R V H E I V N

Região: Central	
Número do Peptídeo	Seqüência
25	L K T F G E W R E R V L
26	F G E W R E R V L L N R

Região: C-terminal	
Número do Peptídeo	Seqüência
56	P S I S E G P S Y E F S
57	S E G P S Y E F S D C S
58	P S Y E F S D C S K D Y

Tabela 4 – Seqüência de aminoácidos dos peptídeos lineares reativos ao soro de coelho antimutalisina II e seus resíduos críticos. Em vermelho os aminoácidos críticos para a ligação com o anticorpo.

As seqüências lineares dos peptídeos n° 4, n° 25 e n° 57 das regiões imunodominantes foram identificadas na seqüência da mutalisina II em um alinhamento feito por Sanchez (1991) e observou-se que estes se localizavam em posições com grande homologia de resíduos conservados com outras metaloproteases hemorrágicas e não-hemorrágicas (figura 6).

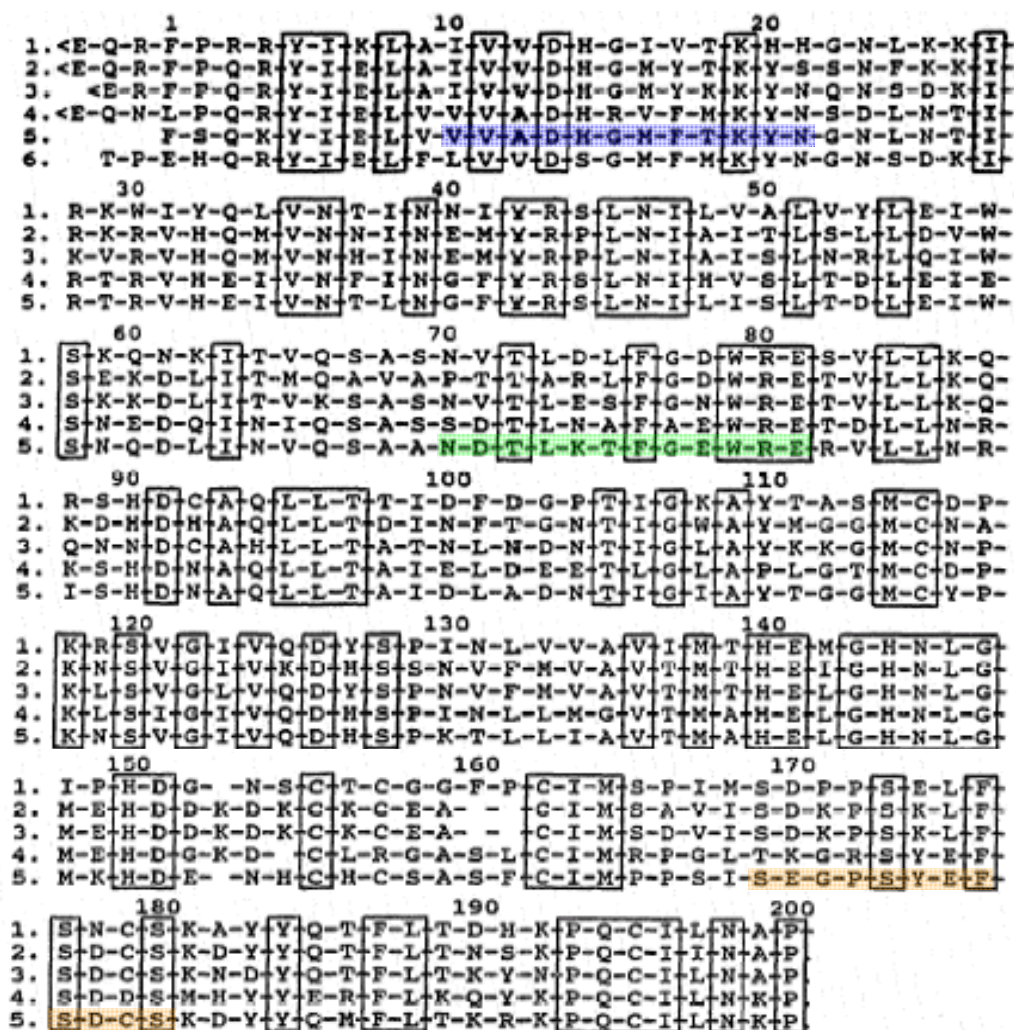


Figura 6 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos da mutalisina II e de metaloproteases hemorrágicas e não-hemorrágicas de venenos de serpentes. 1 - Região N-terminal (domínio metaloproteínase) proteína hemorrágica de alto peso molecular HR1B de *Trimeresurus flavoviridis*; 2 - Proteína hemorrágica de baixo peso molecular HR2a de *T. flavoviridis*; 3 - Metaloproteínase não hemorrágica H₂ de *T. flavoviridis*; 4 - Toxina d, metaloproteínase hemorrágica de *Crotalus atrox*; 5 - Mutalisina II; 6 – Fragmento N-terminal de zinco-metaloproteínase de *Bothrops jararaca*. Os números se referem aos resíduos da mutalisina II. As caixas fechadas representam resíduos que são os mesmos em proteínas de serpentes. Marcado em azul peptídeo n° 4, em verde o n° 25 e laranja o n° 57. Modificado de Sanchez, 1991.

Feita a análise dos peptídeos lineares na seqüência da mutalisina II, foram selecionados os peptídeos n° 4, n° 25 e n° 57 para serem sintetizados e posterior uso como imunógenos.

A partir da seqüência primária da mutalisina II, um modelo molecular por homologia (SALI E BLUNDELL, 1993) foi construído. A figura 7A apresenta a provável estrutura tridimensional da mutalisina II. Os peptídeos n° 4 (VVADHGMFTKYN), n° 25 (LKTFGEWRERVL) e n° 57 (SEGPSYEFSDCS), selecionados pelo imunoenensaio com a membrana de celulose, foram identificados na molécula construída tendo como referencia o sítio ativo da molécula (figura 7B).

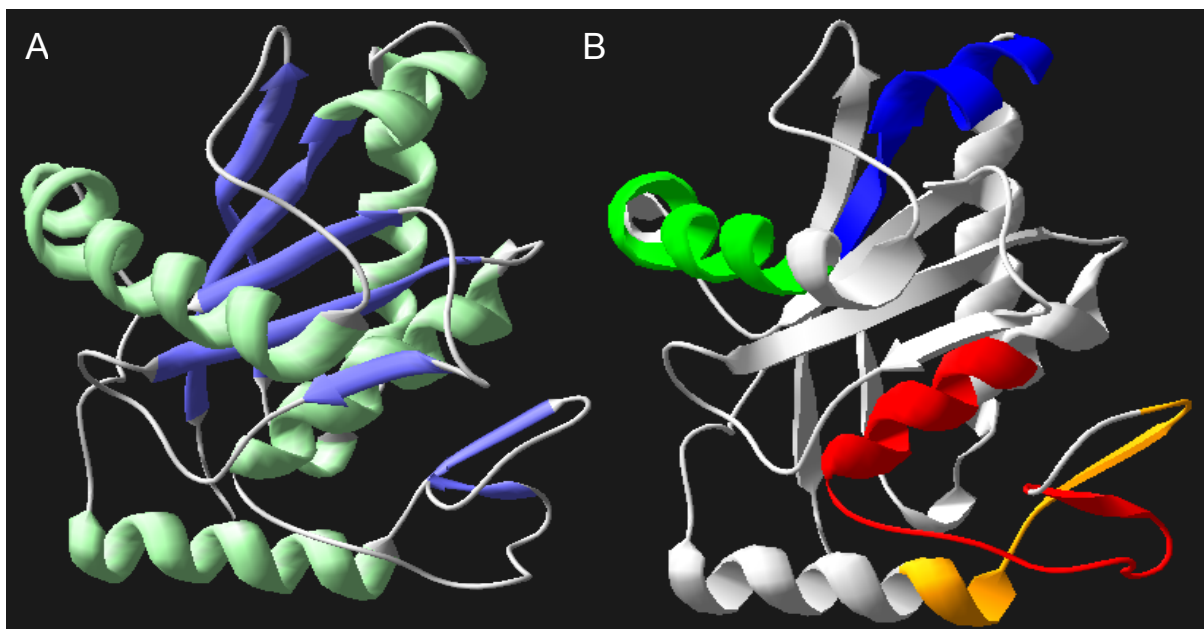


Figura 7 – Possível estrutura tridimensional da mutalisina II e localização espacial dos determinantes antigênicos selecionados por SPOT-síntese. A – Estrutura da mutalisina II. B – Estrutura com os epitopos selecionados por spot-síntese. As regiões com as cores: azul, verde e laranja correspondem a provável localização dos peptídeos n° 4, n° 25 e n° 57 respectivamente. A região vermelha corresponde ao sítio ativo previsto por Sanchez (1991) e Stocker (1995). O modelo foi determinado pelo método de modelagem por homologia (SALI E BLUNDELL, 1993).

4.4 – Síntese química dos epitopos selecionados pelo método de SPOT-síntese.

Feita a seleção dos epitopos, foi realizada a síntese química de peptídeos em fase sólida pela estratégia Fmoc (CARPINO, 1972) dos peptídeos para posterior utilização como imunógenos.

Os peptídeos de nº 4 (VVADHGMFTKYN), nº 25 (LKTFGEWRERVL) e nº 57 (SEGPSYEFSDCS) da mutalisina II foram sintetizados com um resíduo de cisteína (*trt*) no final da seqüência para facilitar o posterior carregamento ao KLH. A síntese foi realizada conforme descrito em material e métodos.

4.4.1 – Perfil cromatográfico dos peptídeos em HPLC e análise por espectrometria de massas.

Os gráficos 4, 5 e 6 mostram os perfis cromatográficos dos peptídeos após a clivagem da resina. Os picos de maior absorbância foram então submetidos à análise por espectrometria de massas.

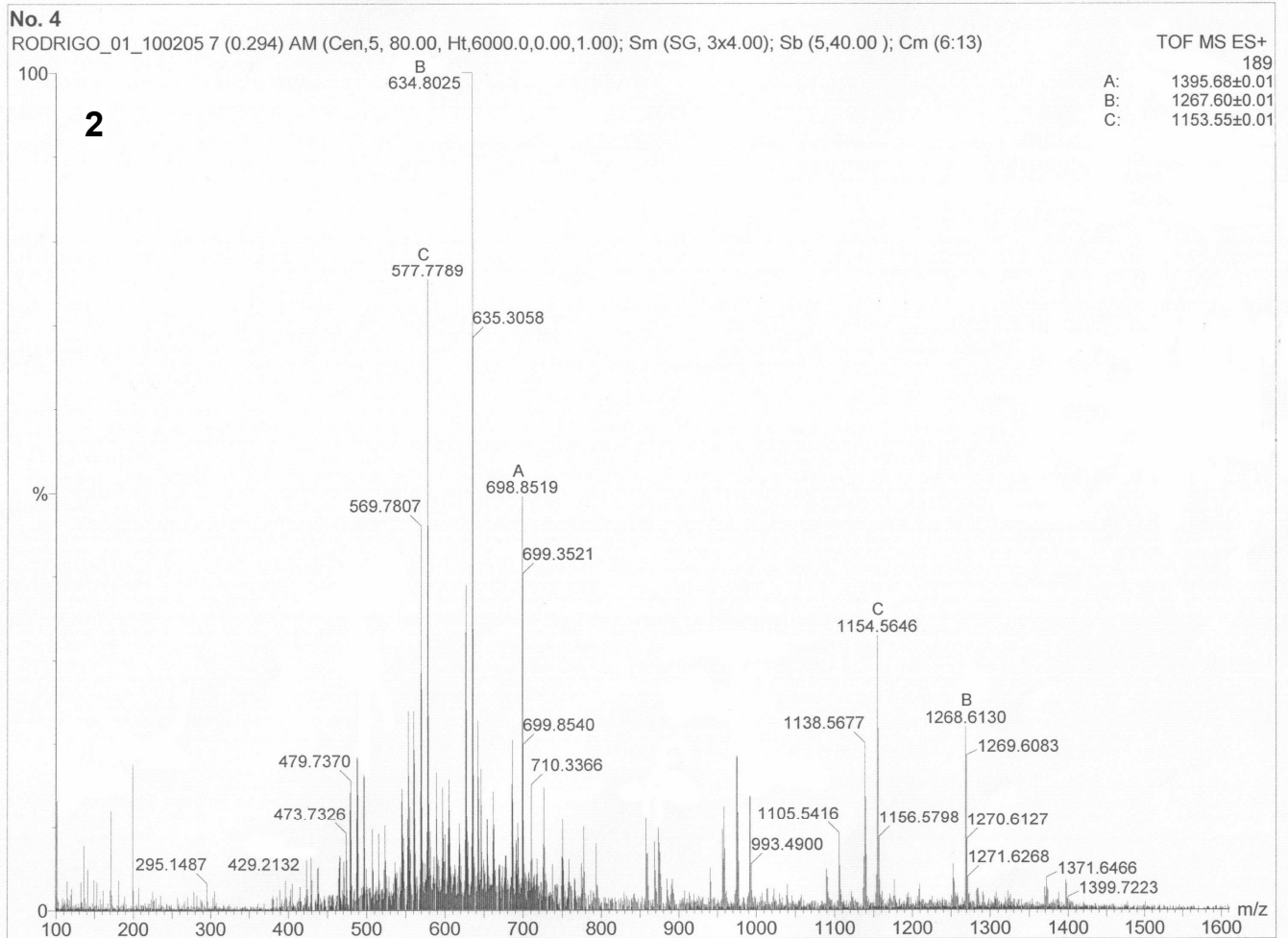
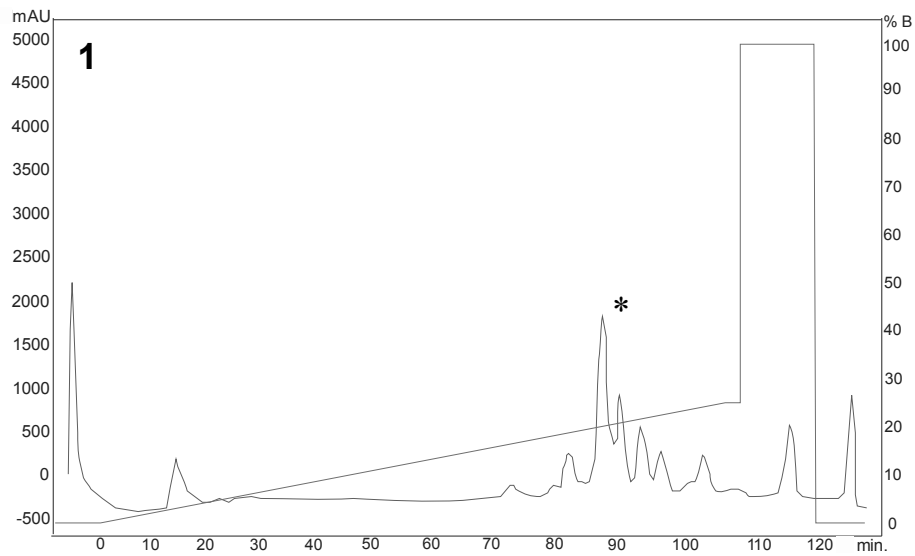


Gráfico 4 – Perfil de purificação do produto bruto da síntese do peptídeo nº 4 (VVADHGMEFTKYN-C) e análise por espectrometria de massas. Em 1 temos o perfil cromatográfico do peptídeo nº 4 (Abs 214nm) e 2 a análise por espectrometria de massa dos produtos gerados na síntese. Os picos marcados (*) foram analisados por espectrometria de massas.

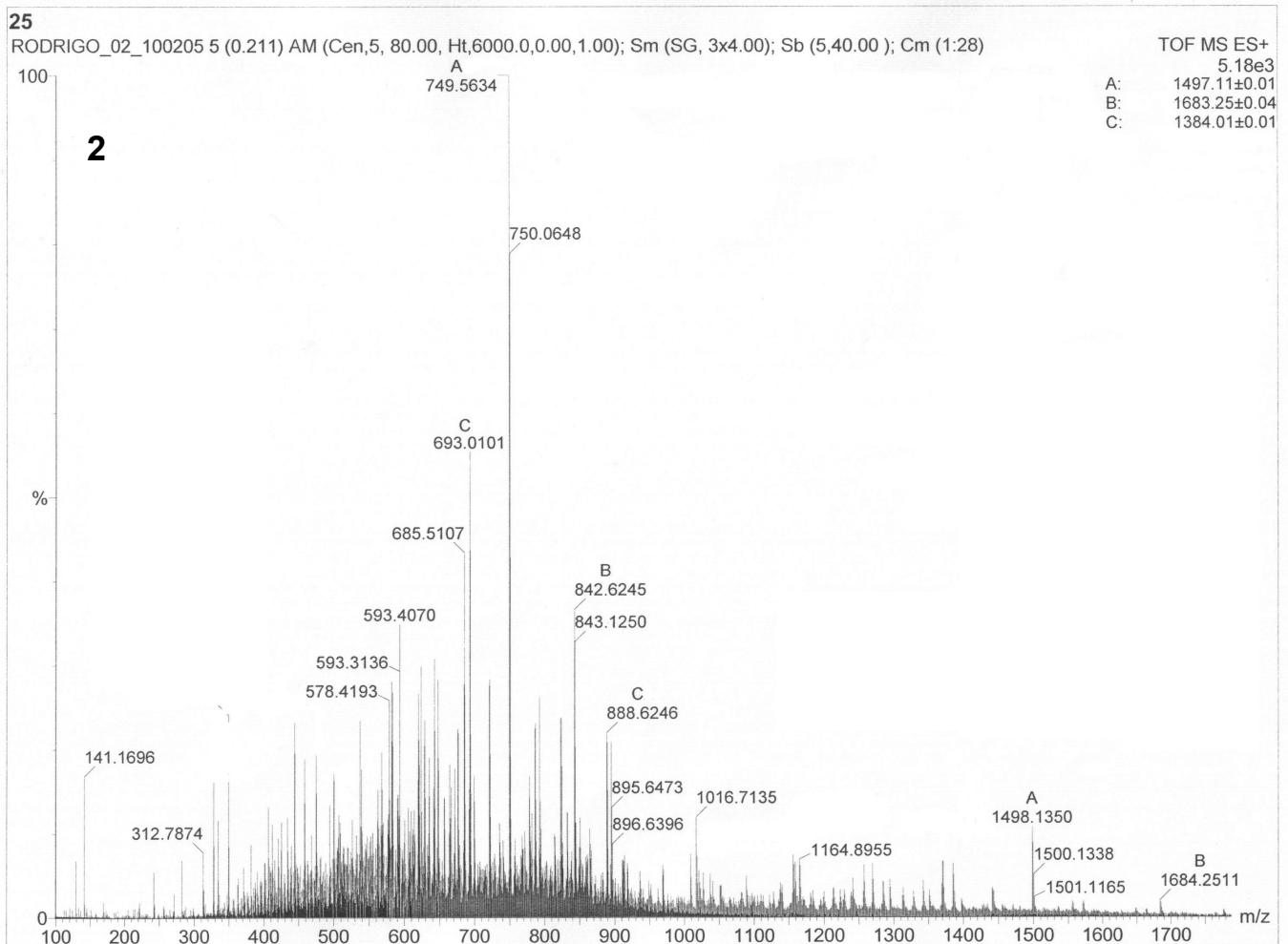
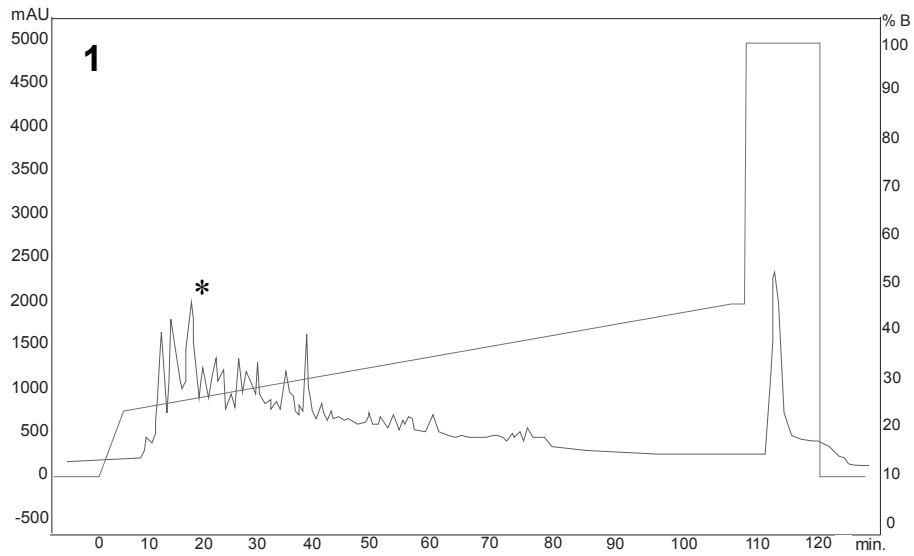


Gráfico 5 – Perfil de purificação do produto bruto da síntese do peptídeo n° 25 (LKTFGWRRERVL-C) e análise por espectrometria de massa. Em 1 temos o perfil cromatográfico do peptídeo n° 25 (Abs 214nm) e 2 a análise por espectrometria de massas dos produtos gerados na síntese. Os picos marcados (*) foram analisados por espectrometria de massas.

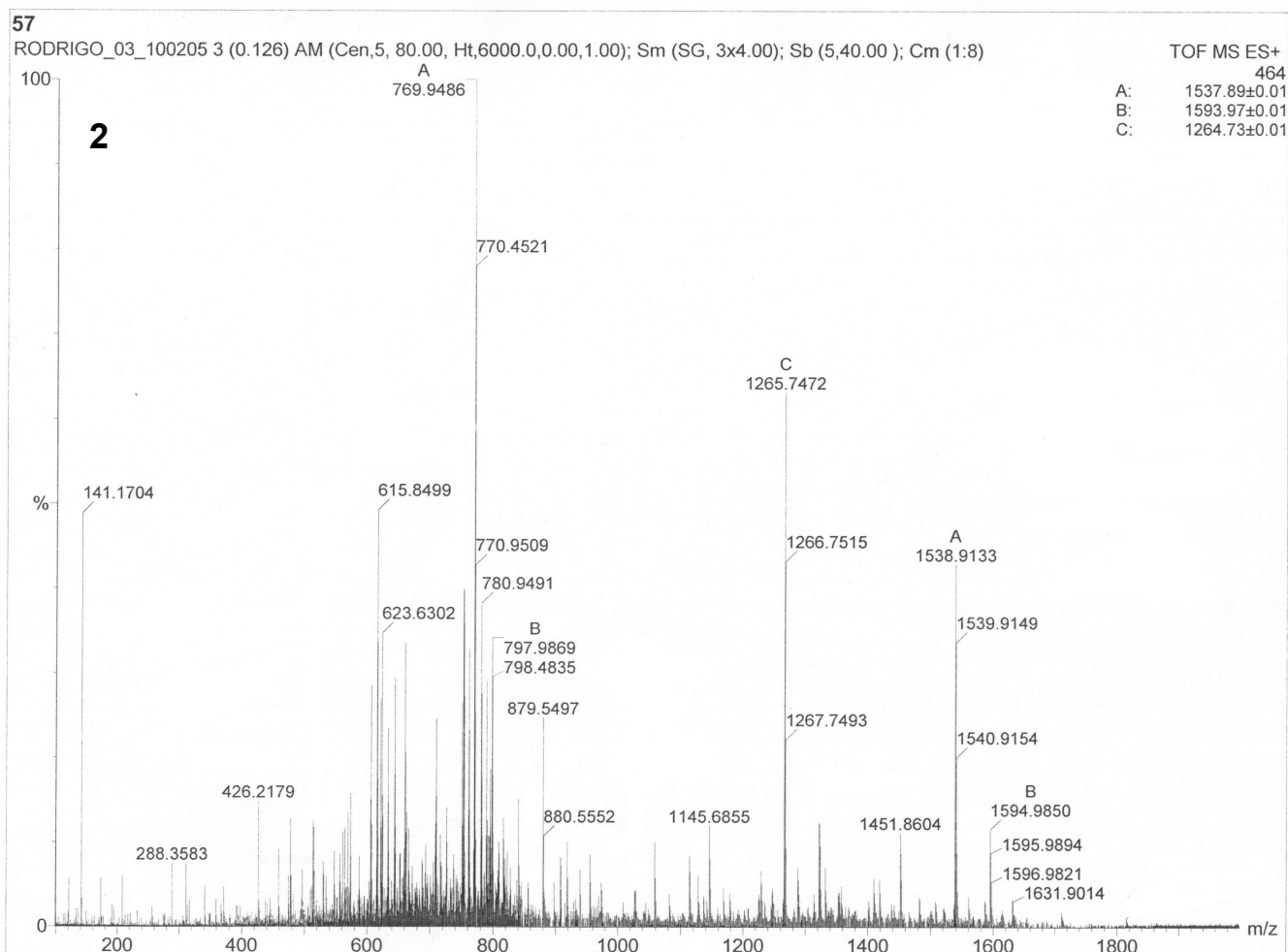
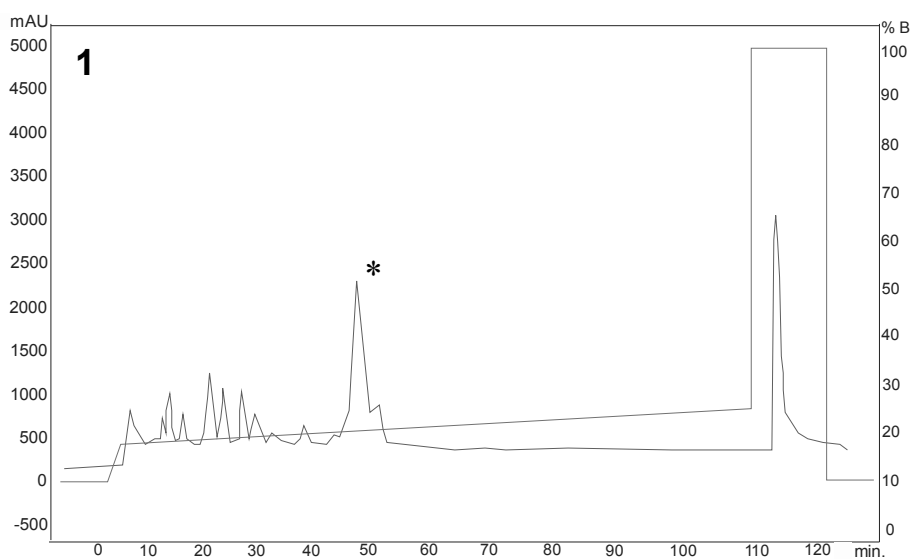


Gráfico 6 – Perfil de purificação do produto bruto da síntese do peptídeo n° 57 (SEGPSYEFSDCS-C) e análise por espectrometria de massa. Em 1 temos o perfil cromatográfico do peptídeo n° 57 (Abs 214nm) e 2 a análise por espectrometria de massa dos produtos gerados na síntese. Os picos marcados (*) foram analisados por espectrometria de massa.

4.5 – Reconhecimento dos peptídeos sintetizados pelo soro de coelho antimutalisina II.

Após a purificação e análise dos peptídeos sintetizados por espectrometria de massa, estes foram ensaiados com o soro de coelho antimutalisina II para averiguar se havia o reconhecimento pelos anticorpos (gráfico 7).

O soro de coelho antimutalisina II foi capaz de reconhecer os peptídeos individualmente e, com este resultado, resolvemos prosseguir com o carregamento destes peptídeos ao KLH. Após o carregamento, o produto final também foi testado para saber se havia o reconhecimento pelo soro de coelho antimutalisina II (gráfico 7).

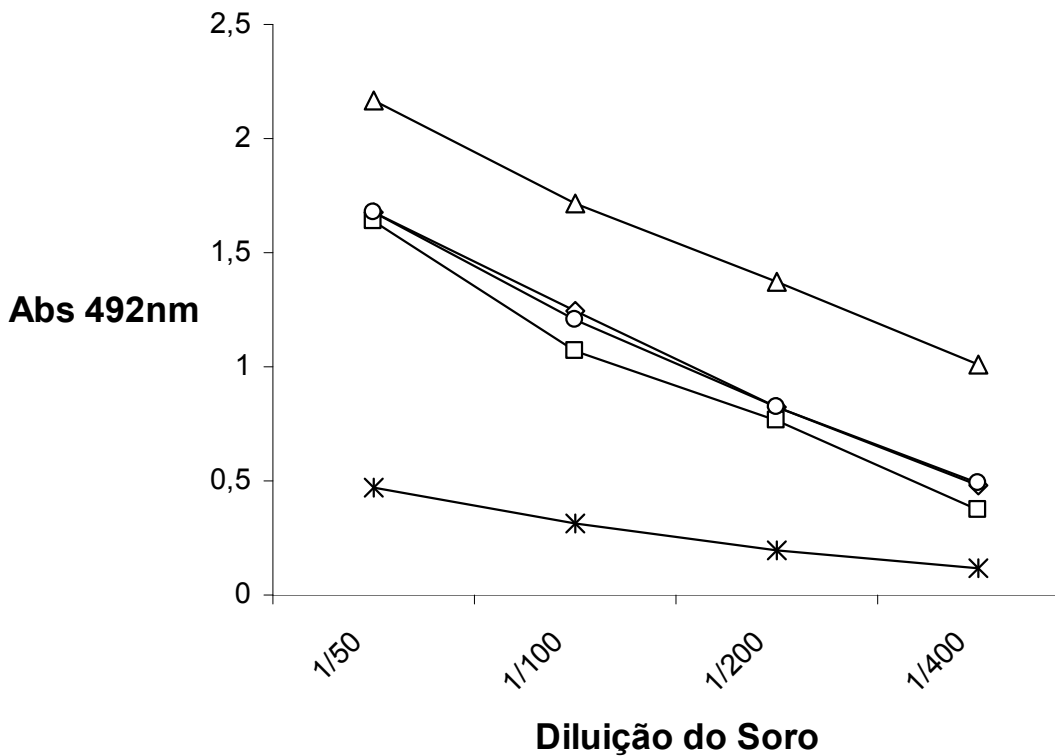


Gráfico 7 – Reconhecimento dos peptídeos sintetizados individualmente e carregados ao KLH pelo soro de coelho antimutalisina II. A placa foi sensibilizada com 1,0µg/poço dos peptídeos nº 4 (- ◊ -), 25 (-□-) , 57 (- ◐ -), ligados ao KLH (- * -) e mutalisina-II (- △ -). O conjugado anticeelho HRP 1:2000. O ensaio prosseguiu conforme descrito em material e métodos.

4.6 – Reatividade dos anticorpos anti-peptídeos.

Os três peptídeos simultaneamente carregados ao KLH foram utilizados em um esquema da imunização utilizando um coelho, como descrito em material e métodos.

Ao final do esquema de imunização o coelho foi sangrado e o título de anticorpos foi quantificado, como mostra o gráfico 8.

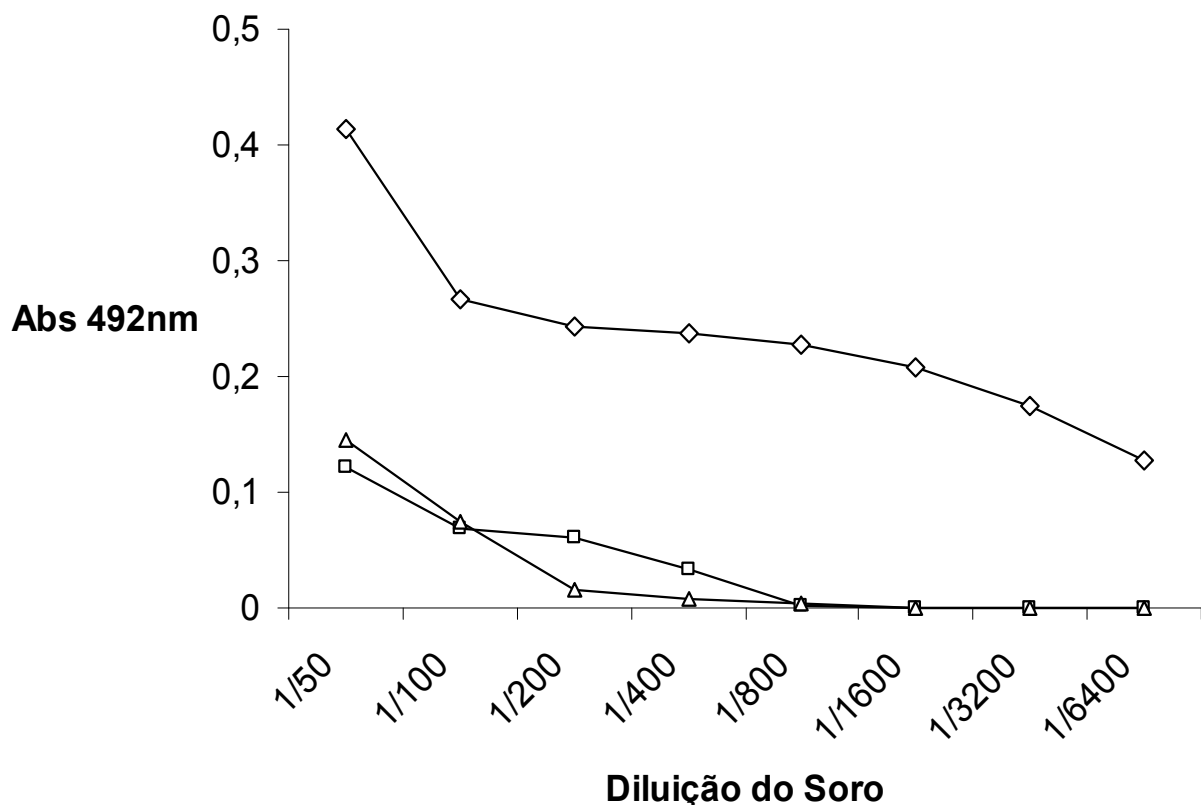


Gráfico 8 – Reatividade dos anticorpos anti-peptídeos carregados ao KLH. A placa foi sensibilizada com 1,0µg/poço de mutalísina II (- ♦ -), veneno de *L. muta muta* (- □ -) e KLH (- Δ -). Conjugado anticoelho HRP 1:2000. A reação prosseguiu como descrito em material e métodos.

4.7 – Estequiometria de inibição da mutalisina II.

A estequiometria da inibição da mutalisina II com IgG de coelho é mostrado no gráfico 9. Crescentes concentrações de IgG foram pré-incubadas com uma concentração fixa de enzima (0,3 μ g) a 37°C por 15 minutos. A atividade proteolítica residual foi determinada pela absorbância da hidrólise do substrato dimetilcaseína.

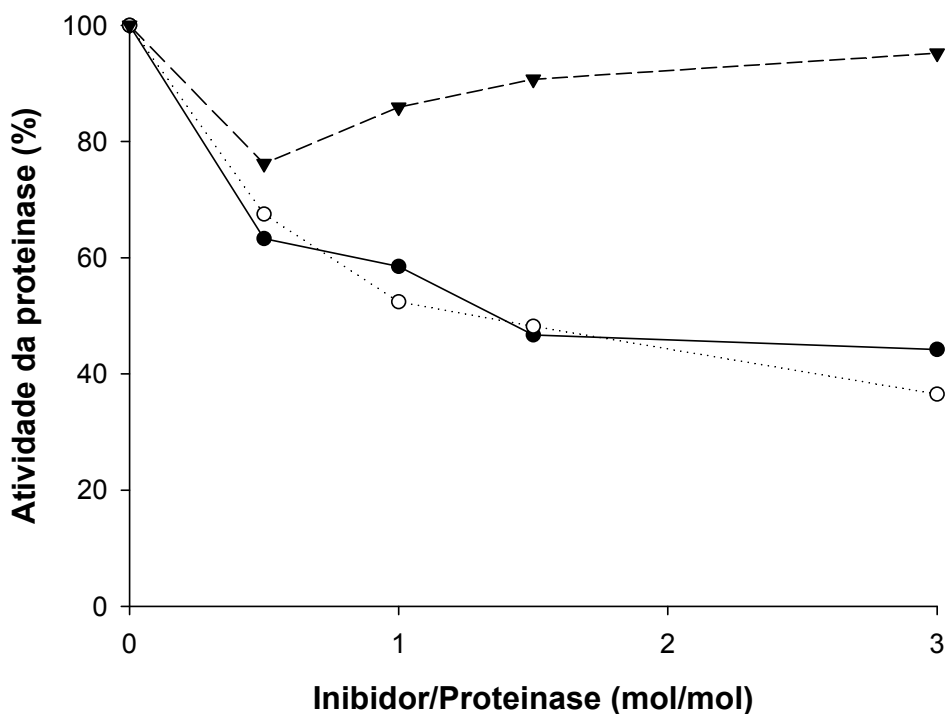


Gráfico 9 – Estequiometria da inibição da mutalisina II pela IgG antimutalisina II e anti-peptídeos. Uma concentração fixa (0,3 μ g) mutalisina II foi pré-incubada com concentrações crescentes de IgG de coelho, como descrito em material e métodos.

(- ▼ -) IgG de coelho anti-KLH, (- ● -) IgG de coelho antimutalisina II e (- ○ -) IgG de coelho anti-peptídeos. O eixo das ordenadas indica a atividade original da enzima em termos de porcentagem.

4.8 – SDS-PAGE do complexo inibidor – mutalisina II.

Uma concentração fixa de enzima (0,3 μ g) foi pré-incubada com concentrações crescentes de IgG de coelho anti-peptídeos na proporção molar de inibidor/ enzima de 0,46:1, 0,92:1 e 2,76:1, como descrito em material e métodos. A mistura foi incubada com fibrinogênio (300 μ g) por 15 minutos à 37°C, como mostra a figura 8.

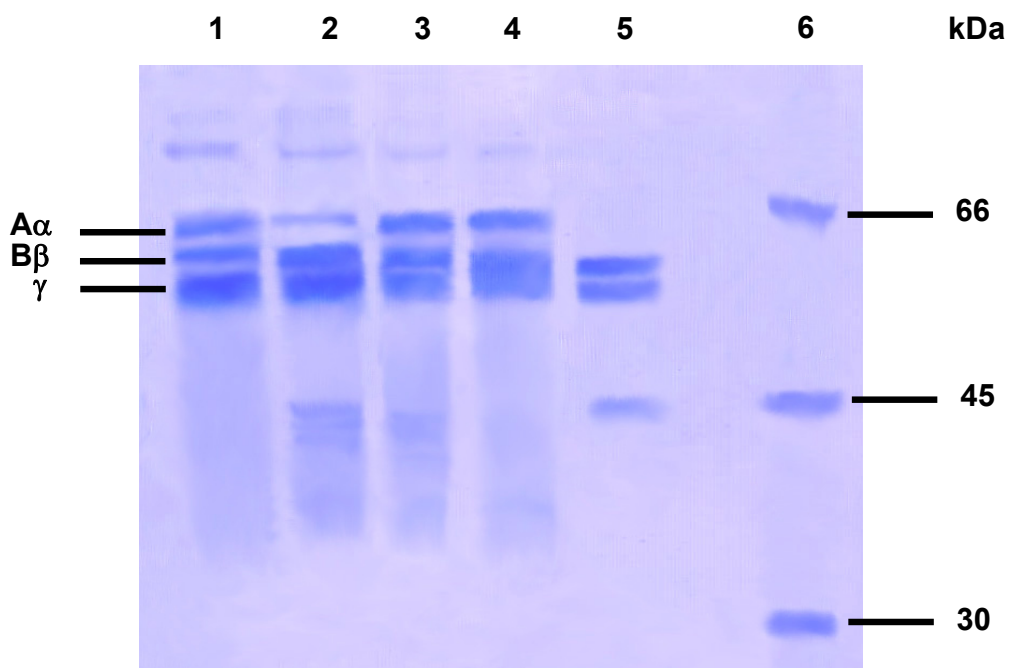


Figura 8 – Inibição da atividade proteolítica da mutalisina II por anticorpos anti-peptídeos. Canaleta 1: controle fibrinogênio; **Canaleta 2:** fibrinogênio com a proporção molar de inibidor / enzima de 0,46:1; **Canaleta 3:** fibrinogênio com a proporção molar de inibidor / enzima de 0,92:1; **Canaleta 4:** fibrinogênio com a proporção molar de inibidor / enzima de 2,76:1; **Canaleta 5:** fibrinogênio com a enzima (sem anticorpos); e **Canaleta 6:** padrão de peso molecular.

O fibrinogênio consiste de três cadeias polipeptídicas, A α (66kDa), B β (54kDa) e γ (48kDa). Na canaleta 2 a enzima ainda está ativa, mesmo depois de incubada por 15 minutos com os anticorpos (degradação da cadeia A α). Com o aumento da proporção de anticorpos a atividade proteolítica da mutalisina II começa a ser inibida.

5 – Discussão

O veneno produzido por serpentes é uma complexa mistura de componentes tóxicos e não-tóxicos que possuem variados efeitos fisiológicos em tecidos excitáveis, sistema cardiovascular, permeabilidade vascular, função renal e homeostase (ESTEVÃO-COSTA, ET AL. 2000). Como foi observado em outras serpentes, o envenenamento por *L. muta muta* leva ao desenvolvimento de hemorragia local e sistêmica.

As metaloproteinases do veneno de serpente (SVMP) são encontradas em altas concentrações no veneno e são aparentemente sintetizadas nas glândulas de veneno como zimogênios inativos e, subsequentemente, ativadas por um mecanismo *cysteine switch-like* (ESTEVÃO-COSTA, ET AL. 2000). As metaloproteinases hemorrágicas têm um papel importante na hemorragia local e, possivelmente, sistêmica em vítima de acidentes com serpentes.

O tratamento recomendado pela Fundação Nacional de Saúde para casos de acidentes ofídicos é o uso do soro heterólogo antiveneno de origem equina. Este soro é capaz de impedir a ação de alguns componentes do veneno e, conseqüentemente, os seus efeitos patológicos. Entretanto, este tratamento pode ser arriscado devido a reações de hipersensibilidade que podem ocorrer durante a infusão do antiveneno e nas duas horas subsequentes.

Com a perspectiva de induzir anticorpos específicos aos epitopos da mutalisina II, e possível neutralização do efeito desta toxina através da imunização com peptídeos sintéticos previamente selecionados, optou-se pelo mapeamento de epitopos lineares usando o método de SPOT. Esta técnica consiste na síntese de múltiplos peptídeos lineares sobrepostos, os quais cobrem toda seqüência primária da proteína. Estes peptídeos estão fixos em um suporte sólido, neste caso, uma membrana de celulose. A membrana contendo os peptídeos da mutalisina II foi usada em ensaios de imunoafinidade e de localização de regiões imunodominantes.

A proteína escolhida para o mapeamento foi a mutalisina II, uma metaloproteinase de cadeia única com 22.5 kDa com grande especificidade de substrato e traços de efeitos hemorrágicos (SANCHEZ et al., 1991, 1995) presente no veneno da serpente

Lachesis muta muta. Como outras metaloproteinases presentes em venenos de serpentes de outras espécies, as mutalisinas degradam proteoliticamente não apenas a fibrina e fibrinogênio, mas também outros componentes da matriz extracelular, como a laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV (SANCHEZ, ET AL. 1998). Devido a isso, a inibição de metaloproteinases do veneno de serpentes é importante para o prognóstico em vítimas acidentadas.

O mapeamento em membrana de celulose, usando-se soro de coelho antimutalisina II, apresentou três regiões principais bastante imunogênicas: a região N-terminal, região Central e região C-terminal. Uma das características observadas nas seqüências peptídicas das regiões imunogênicas selecionadas foi a presença de resíduos de aminoácidos carregados, tanto positivamente como negativamente. MACHADO DE ÁVILA, e cols. (2004), em um trabalho de mapeamento de epitopos, descreveu que estes resíduos são críticos para a ligação entre antígeno com o anticorpo e que alterações destes resíduos em proteínas homólogas resultam em perda de afinidade.

Verificando as seqüências peptídicas nº 4 (V V A D H G M F T K Y N), nº 25 (L K T F G E W R E R V L) e nº 57 (S E G P S Y E F S D C S) em um alinhamento da seqüência primária da mutalisina II com outras metaloproteinases, feito por Sanchez em 1991, podemos observar que alguns dos resíduos considerados críticos para a ligação com os anticorpos são conservados entre outras metaloproteinases. Em 2004 Ramos e Salistre – de – Araújo, em estudos utilizando ferramentas de bioinformática, concluíram que alguns resíduos de aminoácidos são muito conservados entre metaloproteinases hemorrágicas e não hemorrágicas. Um exemplo destes resíduos conservados é a Ser176 que está envolvida em uma ponte de hidrogênio com o Asp148, que está adjacente a histidina que se liga ao íon zinco. Esta Ser176 é importante para estabilização do sítio catalítico e está presente na seqüência do peptídeo nº 57 que foi identificado também pelo anticorpo monoclonal B₂D₄ (Castanheira e cols, 2005 – manuscrito em preparação). Baseando-se nestas observações, as seqüências peptídicas nº 4, nº 25 e nº 57 pertencentes a cada uma das regiões imunogênicas da proteína, foram selecionadas para a síntese química.

Utilizando-se da técnica Fmoc síntese, descrita por CARPINO (1972), foram construídos os peptídeos. No sentido de realizar a conjugação e fusão destes peptídeos a uma proteína carreadora na tentativa de aumentar a eficiência imunológica foi adicionado, à seqüência dos peptídeos previamente estabelecidas, um resíduo de cisteína na porção C-terminal.

Após a síntese química, cada um os peptídeos foram purificados e analisados por espectrometria de massa.

Os peptídeos foram submetidos a ensaios de ELISA indireta com o soro de coelho antimutalisina II para confirmação da atividade antigênica. O resultado da atividade peptídeo / anticorpo confirma os dados dos imunoenaios em membrana apesar do tamanho dos peptídeos em relação aos anticorpos, e sua dificuldade de se ligar a placas de ELISA.

VAN REGENMORTEN (2001), esclarece que peptídeos sintéticos são pouco imunogênicos quando utilizados em imunizações. Esta baixa imunogenicidade é devida ao baixo peso molecular e por suas seqüências estarem simplificadas no contexto molecular, fazendo-se necessário o uso de carreadores ou melhoramentos na arquitetura da síntese com o intuito de melhorar e aumentar a apresentação destes peptídeos ao sistema imunológico. Com a finalidade de produzir anticorpos antipeptídeos, estes epitopos sintéticos foram simultaneamente carreados ao KLH.

O KLH é uma proteína respiratória encontrada em muitas espécies de moluscos e artrópodes. Esta proteína é uma grande molécula, com aproximadamente 8 MDa, que é comumente utilizada na pesquisa e estudos clínicos. Dentre as principais características imunológicas oferecidas pelo KLH, ressalta-se a ativação tanto da resposta imune celular quanto da resposta humoral (HERSH & DIRE, 1974), sua composição rica em carboidratos altamente imunogênicos (VAN KUIK *et al.*, 1990) e por ser evolutivamente distante das proteínas de mamíferos (KUROKAWA, 2002), por este motivo este carreador foi escolhido para os peptídeos sintetizados.

Ensaio para a confirmação do carregamento dos peptídeos ao KLH foram realizados por ELISA indireta utilizando o soro de coelho antimutalisina II. A absorbância observada foi considerada moderada comparada à absorbância obtida no ensaio com os peptídeos individualmente. Mezö e colaboradores (2003) realizaram um trabalho onde

hipóteses para explicar este fato são apresentadas. A primeira interferência descrita por este grupo é que o polystireno, material do qual a placa é feita, pode afetar a acessibilidade do anticorpo ao antígeno ou não ligar adequadamente o carreador à placa. Esta primeira hipótese foi logo descartada, pois Alvarenga et al. (2002) realizou um trabalho parecido neste laboratório e os resultados dos testes de ELISA utilizando peptídeos carreados ao KLH parecem não ter sido afetado por baixa ligação do antígeno à placa.

A segunda hipótese apresentada pelo grupo de Mezö é de que a quantidade de epitopos peptídicos carreados ao KLH não seja suficiente para o reconhecimento desejável dos anticorpos. Esta hipótese pode explicar o baixo título do reconhecimento dos peptídeos carreados ao KLH pelo soro antimutalisina II. A ligação dos peptídeos KLH como descrito em material e métodos assegura no máximo 70% de ligação dos epitopos, mas uma porcentagem menor pode ter ocorrido.

Uma terceira hipótese apresentada por este grupo é de que o KLH, como uma enorme proteína, teria os epitopos carreados a ela distantes um dos outros. Esta distância dificultaria as interações dos peptídeos carreados com o anticorpo, fato este que não ocorre na proteína nativa. Esta hipótese também deve ser considerada já que mesmo havendo uma porcentagem normal de ligação dos epitopos com a proteína carreadora, à distância entre os determinantes antigênicos resultariam em uma baixa ligação com os anticorpos.

Após o ciclo de imunizações com os peptídeos carreados simultaneamente ao KLH, o soro de coelho anti-peptídeos foi submetido a ensaios de ELISA indireta para análise da reatividade frente a mutalisina II, o veneno total de *Lachesis muta muta* e ao KLH. Constatou-se que o soro de coelho anti-peptídeos apresentava uma reatividade moderada contra a mutalisina II e baixa reatividade contra o veneno total e o KLH. O soro de coelho foi então fracionado para a obtenção da fração IgG do soro de coelho anti-peptídeos para utilização em ensaio de inibição da mutalisina II.

No ensaio de inibição da mutalisina II, a atividade da proteinase diminuiu proporcionalmente ao aumento da quantidade de anticorpos. A IgG anti-peptídeos demonstrou capacidade de neutralizar a atividade proteolítica da enzima em 63,5% na relação molar de 1:3. Esta inibição também pôde ser observada em SDS-PAGE onde o

fibrinogênio foi incubado com a mutalisina II previamente incubada com IgG anti-peptídeos. Quando a IgG foi incubada com a enzima na proporção de 0,46:1, pôde-se observar a degradação da cadeia A α , mas com o aumento da proporção de IgG esta degradação diminuiu.

Uma hipótese para esta inibição seria a IgG estar causando impedimento estérico, dado a localização dos epitopos sintetizados na estrutura da mutalisina II. Outro fato que apóia esta hipótese é o não reconhecimento da região do sítio ativo da enzima (peptídeos nº 46 ao 52, correspondentes aos resíduos 137 ao 164 – segundo Sanchez, 1991; Stocker, 1995) pelos anticorpos antimutalisina II.

Souza e colaboradores, em estudos de inibição da mutalisina II, relataram o aparecimento de duas bandas em gel de eletroforese com incubados da enzima com o anticorpo: uma banda de 85 kDa e outra de 23 kDa. Estas bandas foram atribuídas à quebra do anticorpo pela enzima, mas este mecanismo de quebra ainda não foi totalmente esclarecido. Esta questão só pode ser respondida mais precisamente submetendo a enzima e o anticorpo à cristalização e difração de raios-X.

6 – Conclusões

- A técnica de SPOT-síntese se mostrou eficiente para o mapeamento dos determinantes antigênicos da metaloproteinase mutalisina II.
- A estratégia Fmoc de síntese química se mostrou eficiente na construção dos epitopos da mutalisina II.
- Os peptídeos selecionados e sintetizados foram reconhecidos pelo soro de coelho antimutalisina II, mostrando que estas duas técnicas podem ser úteis na identificação de antígenos específicos para a produção de antisoros.
- O uso de peptídeos conjugados ao KLH foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes antimutalisina II.

7 – Perspectivas

- Otimizar a síntese de peptídeos para produzir epitopos sem alterações.
- Utilizar diferentes esquemas de imunização com os peptídeos carreados ao KLH para a produção de anti-soros mais eficientes.
- Realizar testes de inibição de outros venenos de serpente utilizando estes anticorpos antipeptídeos.
- Tentar elucidar o mecanismo de inibição da mutalisina II pelos anticorpos antipeptídeos.

8 – referências bibliográficas.

- ALVARENGA, L.M., DINIZ, C.R., GRANIER, C., CHÁVÉZ-OLÓRTEGUI, C. (2002). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpions toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*. 40, 89-95.
- ASSAKURA, M. T., SILVA, C. A., MENTELE, R., CAMARGO, A.C.M., SERRANO, S. M.T., (2003). Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon*. 41, 217–227.
- BAHRAOUI, E., GRANIER, C., VAN RIESTCHOTEN, J., ROCHAT, H., EL AYEB, M. (1986). Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by Synthetic peptide of scorpion toxin. *Journal of Immunology*. 136, 3371-3377.
- BARAMOVA, E. N., SHANNON, J. D., BJARNASON, J. B., GONIAS, S. L., FOX, J. W. (1990). Interaction of Hemorrhagic Metalloproteinases with Human α 2-Macroglobulin. *Biochemistry*. 29, 1.069-1.074.
- BJARNASON, J.B. AND FOX, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology Trends*. 62, 325-372.
- BOCHNER, R., STRUCHINER, C. J. (2003). Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19 (1), 7-16.
- BORGES, C. C., SADAHIRO, M., SANTOS, M. C. (1999). Epidemiological and clinical aspects of snake accidents in the municipalities of the State of Amazonas, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32 (6), 637-646.

- CALDERON-ARANDA, E.S., OLAMENDI-PORTUGAL, T., POSSANI, L.D. (1995). The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpions toxins. *Vaccine*. 13, 1198-1206.
- CALDERON-ARANDA, E.S., SELISKO, S., YORK, E.J., GURROLA, G.B., STWART, J.M., POSSANI, L.D. (1999). Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibodies specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. *European Journal of Biochemistry*. 264, 746-755.
- CARPINO, L.A. AND HAN, G.Y. (1972). The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *Journal of Organic Chemistry*. 37, 3404-3409.
- CILLI, E.M., OLIVEIRA, E., MARCHETTO, R., NAKAIE, C.R. (1996). Correlation between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties. *Journal of Organic Chemistry*. 61, 8992-9000.
- COEURDACIER, J., LAPORTE, F., PEPIN, J. (2003). Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology*. 14, 435-447.
- COLMAN, R. W., SCHMAIER A. H. (1997). Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes. *Blood*. 90 (10), 3.819-3.843.
- COLOMBINI, M., FERNANDES, I., CARDOSO, D.F., MOURA-DA-SILVA, A.M. (2001). *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon*. 39, 711-719.

- DEVAUX, C., FOURQUET, P., GRANIER, C. (1996). A conserved region of scorpion toxins rendered immunogenic induces broadly cross-reactive, neutralizing antibodies. *European Journal of Biochemistry*. 242, 727-735.
- ENGVALL, E., AND PERLMANN, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8, 871-874.
- ESCALANTEA, T., RUCAVADOA, A., KAMIGUTIB, A. S., THEAKSTONC R. D. G., GUTIERREZ, J. M. (2004) Bothrops asper metalloproteinase BaP1 is inhibited by α 2-macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon*. 43, 213–217.
- ESTEVIÃO-COSTA, M.I., MARTINS, M.S., SANCHEZ, E.F., DINIZ, C.R., OLORTEGUI, C.C. (2000). Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin II. *Toxicon* 38, 139-144.
- ESTEVIÃO-COSTA, M.I., DINIZ, C.R., MAGALHAES, A., MARKLAND, F.S., SANCHEZ, E.F. (2000). Action of metalloproteinases Mutalysin I and II on several components of the hemostatic and Fibrinolytic Systems. *Thrombosis Research* 99, 363-376.
- EY, P.L., POWSE, S.J., JENKING, C.R. (1978). Isolation of pure IgGa, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A sepharose. *Immunochemistry*. 15, 429-436.
- FERNANDES, R. J., HIROHATA, S., ENGLE, J. M., COLIGE A., COHN D. H., EYRE D. R., APTE S. S. (2001). Procollagen II Amino peptide Processing by ADAMTS-3. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (34), 31.502–31.509.
- FRANK, R. (1992). Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron.*, 48, 9217-9232.

- FRANK, R. (2002). The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports – principles and applications. *Journal of Immunological Methods* 267, 13-26.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA (2001). Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ed. COMED/ASPLAN/FNS.
- GIRISH, K.S., SHASHIDHARAMURTHY, R., NAGARAJU, S., GOWDA, T.V., KEMPARAJU, K. (2004). Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*. 86, 193–202.
- GONÇALVES, L. R. C., CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. (2004) High molecular mass kininogen inhibits metalloproteinases of *Bothrops jararaca* snake venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 318, 53–59.
- HARRIS, J.R., MARKL, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 30, 597–623.
- HERSH, E.M., DYRE, S.E., (1974). Cells binding the antigen Keyhole Limpet Haemocyanin in the peripheral blood and in the lymphocyte cultures of non-immune and immunized human subjects. *Clinical Experimental Immunology*. 17 (2), 299-309.
- JIA, L.G., SHIMOKAWA, K.I., BJARNASON, J.B., FOX, J.W. (1996). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the Adams Family of proteins. *Toxicon* 34, 1.269-1.276.
- JIA, L., WANG, X., SHANNON, J. D., BJARNASON, J. B., FOX, J. W. (2000). Inhibition of Platelet Aggregation by the Recombinant Cysteine-Rich Domain of the Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinase, Atrolysin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 373 (1), 281–286.

- JORGE, M.T., SANO-MARTINS, I.S., TOMY, S.C., CASTRO, S.C.B., FERRARI, R.A., RIBEIRO, L.A., WARREL, D.A. (1997). Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. *Toxicon* 35, 545-554.
- JOSHI, M. B., GAM, A. A., BOYKINS, R. A., KUMAR, S., SACCI, J., HOFFMAN, S. L., NAKHASI, H. L., KENNEY, R. T. (2001). Immunogenicity of Well-Characterized Synthetic *Plasmodium falciparum* Multiple Antigen Peptide Conjugates. *Infection and Immunity*. 69 (8), 4884–4890.
- KAMIGUTI, A.S., KUZEL, M., THEAKSTON, R.D.G. (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*. 31, 853-862.
- KARLE, S., NISHIYAMA, Y., TAGUCHI, H., ZHOU, Y. X., LUO, J., PLANQUE, S., HANSON, C., PAUL, S. (2003). Carrier-dependent specificity of antibodies to a conserved peptide determinant of gp120. *Vaccine*. 21, 1,213–1,218.
- KITAGAWA, K., AIDA, C., FUJIWARA, H., YAGAMI, T., FUTAKI, S. (2001). Facile Solid-Phase Synthesis of Sulfated Tyrosine-Containing Peptides: Part II. Total Synthesis of Human Big Gastrin-II and Its C-Terminal Glycine-Extended Peptide (G34-Gly Sulfate) by the Solid-Phase Segment Condensation Approach. *Chemical Pharmacology Bulletin*. 49 (8), 958-963.
- KRISHNAMURTHY, S.V. (2003). Amphibian assemblages in undisturbed and disturbed areas of Kudremukh National Park, central Western Ghats, India *Environmental Conservation* 30 (3), 274–282.
- KUROKAWA, T., WUHRER, M., LOCHNIT, G., GEYER, H., MARKL, J., GEYER, R. (2002). Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal (β 1-6) Man-motifs. *European Journal of Biochemistry*. 269, 5459-5473.

- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- LAUNE, L., MOLINA, F., FERRIÈRES, G., VILLARD, S., BÈS, C., RIEUNIER, F., CHARDES, T., GRANIER, C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunology Method*. 267, 53-70.
- LEONARDI, A., ORTIZ, F. A., GUBENSEK, F., KRIZAJ, I. (1999) Partial primary structure of a fibrinogenase from the venom of the snake *Lachesis stenophrys*. *Journal of Chromatography A*. 852, 237–243.
- LIFSON, J.D., HWANG, K.M., NARA, P.L., FRAZER, B., PADGETT, M., DUNLOP, N.M., AND EIDEN, L.E. 1988. Synthetic CD4 peptide derivatives that inhibit HIV infection and cytopathicity. *Science* 241:712-716.
- LI-GUO. J., KEN-ICHI, S., BJARNASON, J.B., FOX, J. (1996). Snake venom metalloproteinases: Structure, Function and Relationship to the ADAMs Family of proteins. *Toxicon* 34, n° 11/12. 1269-1276.
- LIZANO, S., DOMONT, G., PERALES, J. (2003). Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*. 42, 963–977.
- LIN, Y., MEANS, G., FINNEY, R.E. (1969). The action of proteolytic enzymes on *N,N*-dimethyl proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 244, 789-793.
- MACHADO DE AVILA, R.A., ALVARENGA, L.M., TAVARES, C.A.P., MOLINA F., GRANIER, C., OLOTEGUI, C.C. (2004). Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Titus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon* 44, 233-241.

- MAGALHAES, A., FERREIRA, R.N., RICHARDSON, M., GONTIJO, S., YARLEQUE, A., MAGALHAES, H.P.B., BLOCH, C., SANCHEZ, E.F. (2003). Coagulant thrombin-like enzymes from venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136, 255-266.
- MAZZI, M. V., MARCUSSI, S., CARLOS, G. B., STABELIC, R. G., FRANCO, J. J., TICLI, F. K. CINTRA, A. C.O., . FRANÇA, S. C., SOARES, A. M., SAMPAIO, S. V. (2004). A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44, 215-223.
- MCMILLAN, D. J., BATZLOFF, M. R., BROWNING, C. L., DAVIES, M. R., GOOD, M. F., SRIPRAKASH, K. S., JANULCZYK, R., RASMUSSEN, M. (2004). Identification and assessment of new vaccine candidates for group A streptococcal infections. *Vaccine*. 22, 2.783–2.790.
- MARGLIN, A., AND MERRIFIELD, R. B. (1970). Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 39, 841-866.
- MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 146-156.
- MERY, J., GRANIER, C., JUIN, M., BRUGIDOU, J. (1993). Disulfide linkage to polyacrilic resin for automated Fmoc peptide synthesis. *Immunochemical applications of peptides resins and mercaptoamide peptides*. *International Journal Protein Research*. 42, 44-52.
- MERRIFIELD, R.B. (1965). Solid-Phase Peptide Syntheses. *Endeavour*. 24, 3-7.
- MERRIFIELD, R.B. (1969). The synthesis of biologically active peptides and proteins. *JAMA*. 210 (7), 1247-1254.

- MEZÖ G., DE OLIVEIRA E., KRIKORIAN D., FEIJLBRIEF, M., JAKAB M.A., TSIKARIS V., WELLING-WESTER C. S. S., ANDREU D. AND HUDECZ F. (2003). Synthesis and Comparison of Antibody Recognition of Conjugates Containing Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D Epitope VII. *Bioconjugate Chemistry*. 14, 1260-1269.
- MOLINA, F., LAUNE, D., GOLGAT, G., PAU, B., AND GRANIER, C. (1996). Improved performances of Spot multiple peptides synthesis. *Peptide Res*. 9, 151-155.
- NAGASE, H., WOESSNER JR, J. F., (1999). Matrix Metalloproteinases. *The Journal Of Biological Chemistry*. 274 (31), 21.491–21.494.
- OLSZEWSKA, W., PARTIDOS, C.D., STEWARD, M.W. (2000). Antipeptide Antibody Responses following Intranasal Immunization: Effectiveness of Mucosal Adjuvants. *Infection and Immunity*. Vol. 68, No. 9. 4923-4929.
- OTERO, R., FURTADO, M. F. D., GONÇALVES L. R. C., NUÑEZ, V., GARCIA, M. E., OSORIO, R. G., ROMERO, M., GUTIERREZ, J.M. (1998). Comparative Study of the Venoms of Three Subspecies of *Lachesis muta* (Bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. *Toxicon* 36 (12). 2021-2027.
- PARDAL, P. P. O., SOUZA, S. M., MONTEIRO, M. R. C. C., FAN, H. W., CARDOSO, J. L. C., FRANÇA, F. O. S., TOMY, S. C., SANO-MARTINS, I. S., SILVA, M. C. C. S., COLOMBINI, M., KODERAD, N. F., SILVA, A. M. M., CARDOSO, D. F., VELARDE, D. T., KAMIGUTI, A. S., THEAKSTON, R. D. G., WARRELL, D. A. (2003). Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 98, 28-42.
- PINHO, F.M.O., PEREIRA, I.D.P. (2001). Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 47 (1), 24-29.

- POSNETT, D.N., MCGRATH, H., TAM, J.P. (1988). A Novel Method for Producing Anti-peptide Antibodies. The journal of Biological Chemistry. Vol. 263, No.4. 1719-1725.
- POUGH, F.H., HEISER, J., McFARLAND, W.N. (1999). A vida dos vertebrados. 2^a ed. São Paulo. Atheneu Editora.
- RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. (2004). Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. *Toxicon*. 44, 529–538.
- RUCAVADO, A., SANCHEZ, E. F., FRANCESCHI, A., MAGALHÃES, A., GUTIÉRREZ, J. M. (1999). Characterization of the local tissue damage induced by LHFII, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. 37, 1297-1312.
- RUCAVADO, A., ESCALANTE, T., GUTIERREZ, J. M. (2004). Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon*. 43, 417–424.
- SALI, A., BLUNDELL, T.L., (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spacial restraints. *Journal Molecular Biology*. 234, 779-815.
- SANCHEZ, E.F., MAGALHÃES, A., MANDELBAUM, F.R., DINIZ, C.R. (1991). Purification and characterization of the hemorrhagic II factor from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1074, 347-354.

- SANCHEZ, F. E., DINIZ, C. R. AND RICHARDSON, M. (1991). The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). Federation of European Biochemical Societies. 282 (1), 178-182.
- SANCHEZ, E.F., CORDEIRO, M.N., OLIVEIRA, E.B., JULIANO, L., PRADO, E.S., DINIZ, C. R. (1995). Proteolytic specificity of two hemorrhagic factors, LHF-I and LHF-II, isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). Toxicon. 33, 1061-1070.
- SANCHEZ, E.F., ESTEVÃO-COSTA, M.I., OLORTEGUI, C.C., ASSAKURA, M.T., MANDELBAUM, F.R., DINIZ, C.R. (1995). Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. Toxicon 33, 1653-1667.
- SANCHEZ. E. F., SANTOS, C. I., MAGALHÃES, A., DINIZ, C. R., FIGUEIREDO, S., GILROY., J., RICHARDSON, M. (2000). Isolation of a Proteinase with Plasminogen-Activating Activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) Snake Venom. Archives of Biochemistry and Biophysics. 378 (1) , 131–141.
- SANCHEZ, E.F., SOUZA, C.T., BELLO, C.A., RICHARDSON, M., OLIVEIRA, E.B., MAGALHAES, A. (2003). Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. Toxicon 41, 1021-1031.
- SCHOTT, M. E., WELLS, D. T., SCHLOM, J., ABRAMS, S. I. (1996) Comparison of Linear and Branched Peptide Forms (MAPs) in the Induction of T Helper Responses to Point-Mutated ras Immunogens. Cellular immunology. 174, 199–209.

- SOUZA, C.T., MOURA, M.B., MAGALHÃES, A., HENEINE, L.G.D., OLORTEGUI, C.C., DINIZ, C.R. SANCHEZ, E. F. (2001). Inhibition of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom by human α 2-macroglobulin and rabbit immunoglobulin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 130, 155-168.
- STOCKER, W., GRAMS, F., BAUMANN, U., REINEMER, P., FRANZ-XAVER, G., MCKAY, D.B., BODE, W. (1995). The metzincins – Topological and Sequential relations between astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Science* 4, 823-840.
- TABORDA, C.P., NAKAIE, C.R., CILLI, E.M., RODRIGUES, E.G., SILVA, L.S., FRANCO, M.F., TRAVASSOS, L.R. (2003). Synthesis and Immunological Activity of a Branched Peptide Carrying the T-cell Epitope of gp 43, the Major Exocellular Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 59, 58-65.
- TANJONIA, I., BUTERA, D., BENTO, L., DELLA-CASA, M.B., PORTO, R.M., TEKEHARA, H.A., GUTIÉRREZ, J. M., FERNANDES, I., SILVA, A.M.M. (2003). Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon* 42, 801-808.
- TANJONIA, I., BUTERA, D., SPENCER, P. J., TAKEHARA, H. A., FERNANDES, I., MOURA-DA-SILVA, A.M. (2003). Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. *Toxicon*. 42, 809–816.
- THEAKSTON, R.D.G., WARELL, D.A., GRIFFITHS, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41, 541-557.
- VALLEE, B. L., AULD, D. S. (1989). Short and long spacer sequences and other structural features of zinc binding sites in zinc enzymes. *Federation of European Biochemical Societies*. 257 (1), 138-140.

- VAN REGENMORTEN (2001). Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*. 29 (3-4), 209-213.
- WANG, Q., CHEN, J., LIANG, X., QIU, P., WANG, Y., YAN, G. (2004) Hemorrhagic activity and mechanism of FII, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon actus* venom. *Acta Pharmacologica Clinica*. 25 (4), 514-521.
- ZHENG, X., NISHIO, K., MAJERUS, E. M., SADLER, J. E. (2003). Cleavage of von Willebrand Factor Requires the Spacer Domain of the Metalloprotease ADAMTS13. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (32), 30.136–30.141.
- ZINI, J. M., SCHMAIER, A. H., CINES, D. B. (1993) Bradykinin Regulates the Expression of Kininogen Binding Sites on Endothelial Cells. *Blood*. . 81 (11), 2936-2946.