

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA

MAPEAMENTO DOS PARATOPOS DO ANTICORPO
MONOCLONAL Li mAb(7) ANTI-PROTEÍNA
DERMONECRÓTICA DO VENENO DA ARANHA
Loxosceles intermedia

PATRÍCIA DONADO VAZ DE MELO

Belo Horizonte

Janeiro – 2016

Patrícia Donado Vaz de Melo

**MAPEAMENTO DOS PARATOPOS DO ANTICORPO
MONOCLONAL Li mAb(7) ANTI-PROTEÍNA
DERMONECRÓTICA DO VENENO DA ARANHA
*Loxosceles intermedia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e Imunologia,
Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de
mestre em Bioquímica e Imunologia
Orientador: Dr. Carlos Delfín Chavez
Olórtegui
Co-orientador: Dr. Francisco Santos Schneider

Belo Horizonte

Janeiro – 2016

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela fortuna de encontrar pessoas tão especiais em meu caminho.

Ao Professor Carlos Delfín Chavez Olórtegui por ter me aceitado de braços abertos em seu laboratório com todas minhas limitações, por todo conhecimento compartilhado, disposição em me ouvir e presteza em ajudar. Por ser mais que apenas orientador, por incentivar meu crescimento intelectual, por me defender e auxiliar em absolutamente tudo que precisei. Poucos professores se dedicam tanto a seus alunos.

Ao “Chico”, pela paciência e generosidade em me ensinar, pela compreensão de minha rotina, pela abertura e disposição em discutir resultados e propostas, pela amizade, pelas palavras de apoio e por me guiar no processo da escrita mesmo estando do outro lado mundo.

A Labtest e ao CDICT por me proporcionar a oportunidade de voltar a estudar e por confiar em meu crescimento profissional

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES (TOXINOLOGIA) e pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao departamento de Pós-graduação de Bioquímica e Imunologia por permitir essa experiência de aprendizado.

Ao Professor Leonides Resende Júnior, a quem devo o início dessa jornada e por quem tenho grande admiração, por sempre acreditar e lutar por mim. Pelas palavras amigas, pelos sábios conselhos e pelo exemplo de ser humano.

A Lara pelo apoio e compreensão. Por me cobrir quando estive ausente, por ser chefe-amiga, por me dar autonomia e confiar em mim. Por entender minhas dificuldades neste processo de formação acadêmica.

Ao Dr. Márcio Basques por ser exemplo de integridade e coerência. Por me ensinar a ser profissional e ter raciocínio analítico, pelas cobranças, pelas piadas, risadas e bom-humor, pela boa amizade e companheirismo de tantos anos.

Aos meus pais, por serem meu chão. À minha mãe por ser essa mulher corajosa, forte, otimista e de fé inabalável. Ao meu pai, por ser meu amigo, por me dar alegria e me fazer rir e por ser meu companheiro.

À Sayuri, tão amada e querida. Por não cobrar nada e sempre estar literalmente ao meu lado.

À minha família, em especial Gui pelo apoio e torcida.

Aos meus amigos Taimã e Rafael por estarem presentes toda vez que precisei.

Aos colegas e amigos do CDICT pela amizade, ensinamentos de toda natureza e convivência valiosa.

À Sabrina, Letícia, Edgar e Bárbara pela ajuda direta na realização de experimentos.

A todos os colegas do LABIMQ – Laboratório de Imunoquímica de Proteínas pela convivência, pelos conhecimentos, pelas alegrias e conversas.

Aos colegas do curso de Bases Moleculares pela diversão enquanto estudávamos.

Aos colegas de outros laboratórios pela solidariedade e por cederem à utilização dos equipamentos.

*"O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim:
esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem".*

Guimarães Rosa

Grande Sertão Veredas

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
QUADRO DE AMINOÁCIDOS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Acidentes com aranhas	14
1.2 <i>Loxosceles intermedia</i>	19
1.3 Imunoglobulinas, Li mAb(7) e proteína quimera rCpLi	22
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Determinação da estrutura primária da região variável do anticorpo monoclonal Li mAb(7).....	31
4.2 Identificação das regiões determinantes de complementariedade e predição da estrutura terciária do Fv do anticorpo	31
4.3 Determinação <i>in silico</i> da interação antígeno-anticorpo e identificação dos possíveis resíduos que interagem com a rLiD1, por bioinformática	32

4.3.1	Identificação dos resíduos de aminoácidos que participam da estrutura antígeno-anticorpo.....	32
4.3.2	Análise dos spots reativos de maior intensidade	35
4.4	Síntese dos peptídeos em membrana de celulose	36
4.5	Imunoensaios	37
4.5.1	ELISA Sanduíche e por competição.....	37
4.5.2	Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana	38
4.6	Síntese de peptídeos solúveis	39
4.7	Determinação de estrutura terciária dos peptídeos solúveis	41
4.8	Neutralização da atividade de esfingomielinase “<i>in vitro</i>”	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Sequenciamento da região Fv, identificação das regiões determinantes de complementariedade e determinação da estrutura terciária do Fv do anticorpo Li mAb(7).....	43
5.2	Determinação da interação antígeno-anticorpo e identificação dos possíveis resíduos de Li mAb(7) que interajam com rLiD1 por bioinformática.	44
5.3	Mapeamento do paratopo – Membrana N°1	57
5.4	Mapeamento do paratopo–Membrana N°2	67
5.5	Peptídeos solúveis.....	70
5.6	ELISA	72
5.6.1	ELISA Sanduíche - Antígeno quimera rCpLi e proteína rLiD1	72
5.6.2	ELISA por competição	74
5.7	Neutralização da atividade de esfingomielinase “<i>in vitro</i>”	76
6.	CONCLUSÃO	79

7. PERSPECTIVAS	81
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	83

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Morfologia da aranha <i>Loxosceles intermedia</i>	20
Figura 2 Proporções relativas de cada grupo de toxina sobre o total de transcritos codificadores de toxinas obtidos por Expressed Sequence Tag (EST)	21
Figura 3 Representação esquemática da estrutura de uma molécula de anticorpo	23
Figura 4 Proteína quimera recombinante rCpLi de <i>Loxosceles intermedia</i>	27
Figura 5 Estrutura terciária do Fv do anticorpo Li mAb(7).....	44
Figura 6 Interação entre rLiD1 e CDR's do anticorpo Li mAb(7)..	45
Figura 7 Membrana de celulose N°1 após revelação.....	61
Figura 8 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos reativos com o software Clustal Omega.....	64
Figura 9 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos reativos com o software Clustal W2.	65
Figura 10 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos não reativos com o software Clustal Omega.....	65
Figura 11 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos não reativos com o software Clustal W2..	66
Figura 12 Membrana de celulose N° 2 após revelação.....	67
Figura 13 Estrutura terciária do peptídeo solúvel 607.....	70
Figura 14 Estrutura terciária do peptídeo solúvel 642.....	71
Figura 15 ELISA Sanduíche de ligação entre peptídeos (607 e 642) e rLiD1 e quimera rCpLi.....	73
Figura 16 Estrutura terciária do peptídeo solúvel 642 (em azul) e peptídeo 607 (em rosa), dispostos lado a lado.....	74

Figura 17 ELISA por competição entre Li mAb(7) e peptídeos (607 e 642)..... 75

Figura 18 Avaliação da capacidade inibitória dos peptídeos 607 e 642 sobre atividade de esfingomielinase da rLiD1..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição do tipo de aranha causadora do acidente por faixa etária (número total de casos) de 2009 a 2013.....	14
Tabela 2 Incidência de casos de acidentes por aranhas. Brasil e Grandes Regiões de 2000 a 2013	15
Tabela 3 Óbitos por picada de aranhas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 2000 a 2013	16
Tabela 4 Distribuição dos acidentes por <i>Loxosceles</i> em função da unidade federativa, tipo de agente causador da picada, forma clínica e percentual de tratamento soroterápico	17
Tabela 5 Classificação dos acidentes causados por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> , manifestações clínicas e tratamento.	18
Tabela 6 Resíduos (13) da cadeia leve do LimAb(7) participantes da interação antígeno-anticorpo, identificados a partir da análise das estruturas obtidas após a remoção dos aminoácidos do anticorpo mais distantes que 4 Å do antígeno.	47
Tabela 7 Resíduos (25) da cadeia pesada do LimAb(7) participantes da interação antígeno-anticorpo, identificados como a partir da análise das estruturas obtidas após a remoção dos aminoácidos do anticorpo mais distantes que 4 Å do antígeno.....	51
Tabela 8 Sequência primária dos peptídeos resultante da análise manual da interação antígeno- anticorpo.....	56
Tabela 9 Sequências primárias dos peptídeos sintetizados na membrana 1	58
Tabela 10 Identificação de paratopos por Spot Synthesis membrana N°1	63
Tabela 11 Identificação de paratopos por Spot Synthesis membrana N°2.....	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol
CBS	Tampão Ácido Cítrico, NaCl, KCl
CDR	Região Determinante de Complementariedade
DCM	Diclorometano
DEIA	Diisopropiletilamina
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DMN	Dose Mínima Necrosante
DNF	Fator Dermonecrótico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Fab	Fragmento de Ligação do Anticorpo
Fc	Fragmento Cristalizável
Fmoc	Fluorenil metil oxicarbonila
FR	Regiões Estruturais
Fv	Fragmento Variável
HBTU	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)
HOBT	Hidroxibenzotriazol
Kd	Constante de Dissociação
Li mAb(7)	Anticorpo Monoclonal anti- <i>Loxosceles intermedia</i> 7
LiD1	Proteína Dermonecrótica 1 de <i>Loxosceles intermedia</i>
MIMOP	Programa de Predição de Mimotopo
MTT	Tiazolil Blue
OPD	Ortofenilenodiamino
PBS	Tampão Salina Fosfato
PDB	Banco de Dados de Proteínas
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
rCpLi	Proteína Recombinante Quimérica de LiD1
rLiD1ou recLiD1	Proteína Dermonecrótica Recombinante 1 de <i>Loxosceles intermedia</i>
SAA	Soro Antiaracnídeo
SaLox	Soro Antiloxoscélico
Smase D	Esfingomielinase D
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Simples
TBS	Tampão Tris, KCl, NaCl
TFA	Ácido Trifluoroacético
TIPS	Tri-isopropil silano
VH	Cadeia Pesada do Domínio Variável
VL	Cadeia Leve do Domínio Variável

QUADRO DE AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato ou Ácido aspártico	Aps	D
Cisteína	Cys, Cis	C
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Glicina	Gly, Gli	G
Glutamato ou ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys, Lis	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp, Tri	W
Valina	Val	V

RESUMO

O veneno da aranha *Loxosceles intermedia* contém proteínas com atividade de esfingomielinase (Smase D), principal componente dermonecrótico, responsável pelas preponderantes características do loxoscelismo cutâneo e cutâneo visceral como: a dermonecrose e insuficiência renal aguda. A partir da imunização de camundongos com o veneno bruto da aranha *Loxosceles intermedia*, nosso grupo obteve o anticorpo monoclonal Li mAb(7), que demonstrou ser capaz de neutralizar a atividade dermonecrótica do veneno da *L. intermedia* numa relação dose-dependente; 50 µg de Li mAb(7) neutralizou significativamente 10 µg de veneno bruto e, portanto possui alto potencial para ser utilizado na terapia antiveneno. Além disso, o Li mAb(7) não possui reatividade cruzada com venenos de *Loxosceles laeta* (Brasil), *L. laeta* (Peru) e *Loxosceles gaucho*. Visando a obtenção de peptídeos com elevado potencial neutralizante dos efeitos tóxicos da *L. intermedia*, capazes de superar dificuldades na produção de soros, como a obtenção do veneno e a reprodutibilidade inter e intraindividual da atividade neutralizante do soro, este estudo se dedicou ao mapeamento dos paratopos do Li mAb(7). Utilizando ferramentas de bioinformática e a metodologia Spot Synthesis, as regiões determinantes de complementariedade foram identificadas, peptídeos em membrana de celulose foram sintetizados a partir da análise estrutural da interação antígeno-anticorpo e os aminoácidos essenciais para o reconhecimento da proteína com atividade de esfingomielinase e suas localizações foram mapeadas. Na sequência, peptídeos solúveis foram produzidos. Por ensaio de ELISA sanduíche foi demonstrado que os peptídeos se ligam, de uma maneira específica e dose-dependente, ao mesmo epitopo conformacional reconhecido pelo Li mAb(7). No entanto, o ensaio de ELISA por competição não confirmou a disputa entre os peptídeos solúveis (607 e 642) e o anticorpo monoclonal pelo mesmo sítio de ligação. Tampouco a capacidade neutralizante da atividade de esfingomielinase foi demonstrada. Assim, demonstrou-se que os peptídeos solúveis originados do mapeamento do Li mAb(7), reconhecem especificamente o mesmo epitopo e por ferramentas de bioinformática possuem estrutura conformacional semelhante a região Fv do anticorpo.

Palavras chave: *Loxosceles intermedia*, esfingomielinase D, componente dermonecrótico, Li mAb(7), neutralização, mapeamento, paratopo, peptídeos

ABSTRACT

The venom of the spider *Loxosceles intermedia* contains proteins with sphingomyelinase activity (SMase D), the main dermonecrotic component responsible for the prevalent symptoms of cutaneous and cutaneous visceral loxoscelism like dermonecrosis and acute renal failure. After the immunization of mice with crude venom of *Loxosceles intermedia* spider, our group obtained the monoclonal antibody Li mAb(7), which has been shown to neutralize the dermonecrotic activity from the venom of *L. intermedia* in a dose-dependent relationship, 50 ug Li mAb(7) neutralized 10 µg of crude venom, and therefore has high potential for use in anti-venom therapy. In addition, the monoclonal antibody Li mAb(7) showed no cross-reactivity with venoms of *Loxosceles laeta* (Brazil), *L. laeta* (Perú) and *Loxosceles gaucho*. In order to obtain peptides with high potential neutralizing the toxic effects of *L. intermedia*, which are able to overcome difficulties in the production of sera, like the poison obtainment and the maintenance of serum neutralization capacity, this study was dedicated to the mapping of paratope of Li mAb(7). Using on bioinformatics tools and Spot Synthesis methodology the complementarity determining regions were identified, peptides on cellulose membrane were synthesized from structural analyzes of antigen-antibody interactions and the essential amino acids residues for recognition of the protein with sphingomyelinase activity and their locations have been mapped. The soluble peptides were produced and sandwich ELISA assay demonstrated that peptides bind in a specific and dose-dependent manner, the same conformational epitope recognized by Li mAb(7). Competition ELISA assay did not confirm the competition for the same binding site between soluble peptides (607 and 642) and monoclonal, however, it is believed that due to high affinity of antibody for the epitope. Neither the neutralizing capacity of sphingomyelinase activity was demonstrated. Thus, it was demonstrated that peptides derived from the soluble mapping Li mAb(7) specifically recognize the same epitope and have a conformational structure similar to the Fv region of the antibody.

Keywords: *Loxosceles intermedia*, sphingomyelinase D, component dermonecrotic, Li mAb (7), neutralization, mapping, paratope, peptides

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes com aranhas

Acidentes causados por aranhas são comuns, porém a maioria não apresenta relevância clínica. Os gêneros de importância em saúde pública no Brasil são: *Loxosceles* (aranha-marrom), *Phoneutria* (aranha armadeira ou macaca) e *Latrodectus* (viúva-negra). Dentre estes, o maior causador de acidentes é o gênero *Loxosceles* (Tabela 1).

Tabela 1 Distribuição do tipo de aranha causadora do acidente por faixa etária (número total de casos) de 2009 a 2013

Faixa etária	Phoneutria nº casos	Phoneutria %	Loxosceles nº casos	Loxosceles %	Latrodectus nº casos	Latrodectus %
< 1	179	0.92	448	1.13	13	2.32
1 – 4	710	3.64	1,911	4.82	25	4.46
5 – 9	833	4.26	1,745	4.4	30	5.36
10 – 14	888	4.55	1,858	4.69	42	7.5
15 – 19	1,252	6.41	3,230	8.15	49	8.75
20 – 39	5,605	28.71	15,196	38.86	190	33.9
40 - 59	6,325	32.4	11,333	28.6	136	24.3
60 - 64	1,206	6.18	1,502	3.8	18	3.21
65 - 69	1,027	5.26	1,057	2.67	25	4.5
70 - 79	1,193	6.11	1,043	2.63	26	4.64
> 80	305	1.56	294	0.75	6	1.07
Total	19,523	100	39,617	100	560	100
	(32.8%)		(66.3%)		(0.9 %)	

Fonte: Adaptado de: (A. M. da Silva, Bernarde, and Abreu 2015)

No Brasil, sete espécies têm sido relatadas, a maioria delas nas regiões sul e sudeste (Sezerino et al. 1998), mas três (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) estão implicadas principalmente no envenenamento humano (Málaque et al. 2002).

Os acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* ocorrem principalmente nos meses mais quentes do ano, predominantemente durante a primavera e o verão (Appel et al. 2005; P. H. da Silva et al. 2004). Um aumento crescente no número de acidentes envolvendo picada de aranhas pode ser observado entre os anos de 2000 e 2013 (Tabela 2).

Tabela 2 Incidência de casos de acidentes por aranhas. Brasil e Grandes Regiões de 2000 a 2013

Região	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Norte	95	145	222	473	458	543	558	408	444	592	547	737	825	814	6861
Nordeste	214	257	329	389	448	524	620	609	509	766	925	1114	1184	1242	9220
Sudeste	1438	2117	2713	2601	3747	4405	4190	4432	4672	6176	5439	6094	7218	8671	63913
Sul	1427	8106	9439	12057	12864	13449	13027	17078	15545	16502	17368	18063	15683	15875	186483
Centro Oeste	83	119	127	155	241	293	327	249	308	428	442	481	632	523	4408
Brasil	3257	10744	12830	15675	17758	19214	18722	22776	21568	24464	24721	26489	25542	27125	270285

Fonte: Adaptado de: Ministério da Saúde do Brasil. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br>

No Brasil, o loxoscelismo, termo usado para representar acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles*, foi responsável por 66,3% das 59.700 picadas de aranha com gênero identificado, notificadas ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde), entre 2009 e 2013 (A. M. da Silva, Bernarde, and Abreu 2015; Sezerino et al. 1998). As aranhas da espécie *L. intermedia* são predominantes no ambiente urbano do Paraná e Santa Catarina (Marques-da-Silva and Fischer 2005), (Gonçalves de Andrade, Lourenço, and Tambourgi 2000). No estado do Paraná, no período de 1993 a 2000, foram notificados 42.280 acidentes com animais peçonhentos, sendo a aranha *Loxosceles* o agente causador em 48,9% dos casos. Na região metropolitana de Curitiba, o loxoscelismo é particularmente proeminente, pois apresentou 76% do total dos casos (Ribeiro et al. 1993).

Tabela 3 Óbitos por picada de aranhas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 2000 a 2013

Região	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Norte	0	1	0	0	0	1	0	6	0	1	1	0	2	2	14
Nordeste	0	0	0	0	0	0	2	4	2	4	4	3	1	8	28
Sudeste	1	2	0	1	1	3	1	0	8	3	0	2	4	13	39
Sul	1	6	2	2	4	4	6	4	1	7	2	6	4	13	62
Centro Oeste	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	4	0	0	9
Brasil	2	9	2	4	5	8	9	15	12	16	8	15	11	36	152

Fonte: Adaptado de: Ministério da Saúde do Brasil. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br>

O loxoscelismo cutâneo está associado a uma série de sintomas clínicos, incluindo lesões cutâneas, que se espalham por gravidade a partir da picada. As lesões são caracterizadas por feridas necrosantes que são da cor azul-violeta escuro e tornam-se endurecidas, levando à formação de tecido cicatricial. Em torno da lesão, também há eritema e edema.

No loxoscelismo sistêmico, condição menos frequente que o cutâneo, os doentes podem apresentar febre, fraqueza, vômitos, reações pruriginosas, insuficiência renal e distúrbios hematológicos que podem incluir trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada e anemia hemolítica (Futrell 1992; P. H. da Silva et al. 2004; Young and Pincus 2000; Kalapothakis et al. 2002; De Castro et al. 2004). Os dados da tabela 3 indicam que o número de óbitos no Brasil envolvendo picada de aranhas, entre os anos de 2000 e 2013, é pequeno e, portanto, a morbidade e as sequelas da condição cutânea são mais importantes que a mortalidade quando se trata de aranhas do gênero *Loxosceles*.

O tratamento médico de picadas de *Loxosceles* é controverso. A terapia não específica envolve a prescrição de corticosteróides, como a

prednisona, e dependendo da evolução pode ocorrer administração de antibióticos, excisão cirúrgica de lesões necróticas, transfusão de sangue e hemodiálise (Ribeiro et al. 1993).

O tratamento específico pode ser realizado com o soro antiloxoscélico (SaLox) e, na ausência deste, com o antiaracnídeo (SAA), conforme o protocolo clínico proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil.

No Brasil, a frequência de utilização do antiveneno varia conforme as experiências regionais. A tabela 4 correlaciona a distribuição dos acidentes por *Loxosceles* em função da unidade federativa, tipo de agente causador da picada, forma clínica do acidente e percentual da utilização do tratamento soroterápico (Ministério da Saúde, 2001).

De acordo com a tabela 4, percebe-se que dentre as três espécies de *Loxosceles* de relevância em saúde pública, aquela da qual há menor adoção de tratamento antiveneno para sua picada é a de *Loxosceles intermedia*, mesmo sendo esta o principal causador de acidentes.

Tabela 4 Distribuição dos acidentes por *Loxosceles* em função da unidade federativa, tipo de agente causador da picada, forma clínica e percentual de tratamento soroterápico

UF	Agente mais comum	Período (anos)	Nº de casos	% cutânea	% Cut. Visceral	% Uso de Soro	% Letalidade
SP	<i>L. gaucho</i>	1984-93	297	96,9	3,1	70,0	0,3
PR	<i>L. intermedia</i>	1990-95	9.980	99,8	0,15	11,9	0,1
SC	<i>L. laeta</i> *	1984-96	267	86,9	13,1	46,8	1,5
RS	<i>Loxosceles sp.</i>	1990-95	873	87,6	12,6	54,9	0,1

*Acidentes de maior gravidade

Fonte: Adaptado de: Manual de Diagnóstico e Tratamento de acidentes por Animais peçonhentos, Ministério da Saúde do Brasil. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br/>

No entanto, as recomendações para utilização do antiveneno dependem também da classificação do tipo de acidente, gravidade e manifestações clínicas como demonstradas na tabela 5 (Ministério da

Saúde, 2001). Portanto, há uma estreita relação entre a forma clínica e gravidade que determina a conduta na utilização ou não de soroterapia.

Tabela 5 Classificação dos acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles*, manifestações clínicas e tratamento.

ACIDENTE	CLASSIFICAÇÃO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	TRATAMENTO
Loxoscelismo Cutâneo	LEVE	Lesão incharacterística; Sem comprometimento do estado geral; Sem sinal de hemólise; A identificação da aranha é necessário para confirmação do caso.	Sintomático; Orientar o paciente a retorno diário, a cada 12 horas.
	MODERADO	Lesão provável ou “característica (com placa marmórea < 3 cm); Com ou sem comprometimento do estado geral; Sem sinal de hemólise	Prednisona: 5 dias; Adulto: 40 mg/dia Criança: 0,5 – 1 mg/Kg/dia (máximo 40 mg/Kg/dia) Sintomático
	GRAVE	Lesão “característica (com placa marmórea < 3 cm); Com ou sem comprometimento do estado geral; Sem sinal de hemólise.	SaLox/SAA IV: 5 ampolas Prednisona: 7 dias Adulto: 40 mg/dia Criança: 0,5 – 1 mg/Kg/dia (máximo 40 mg/Kg/dia); Sintomático.
Loxoscelismo Cutâneo-hemolítico	GRAVE	Presença o não de lesão local significativa e dor; Hemólise confirmada por exames complementares.	SaLox/SAA IV: 10 ampolas Prednisona: 7 dias Adulto: 40 mg/dia Criança: 0,5 – 1 mg/Kg/dia (máximo 40 mg/Kg/dia); Sintomático; Hidratação adequada visando manter boa perfusão renal

Fonte: Modificado de: Manual de Diagnóstico e Tratamento de acidentes por Animais peçonhentos, Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>

É importante citar que os resultados da soroterapia são controversos porque o soro antiaracnídeo é menos eficiente em neutralizar as atividades dermonecróticas e letais do veneno de *L. intermedia* (Braz et al. 1999) e seu grande potencial está relacionado à sua administração nas primeiras horas após o envenenamento (Pauli et al. 2006; Futrell 1992; L Felicori et al. 2006).

Além disso, a terapia antiveneno tem seu valor terapêutico reduzido, pois a maioria dos pacientes chega ao hospital depois de 24 horas de ocorrido o acidente (Pauli et al. 2006). Considerando-se estes fatores em conjunto, a reduzida utilização da soroterapia em acidentes por picadas de aranhas do gênero *Loxosceles*, pode ser explicada.

1.2 Loxosceles intermedia

As aranhas do gênero *Loxosceles* possuem uma cor que pode variar de um marrom claro a escuro (Figura 1A), possuem comprimento de 1 a 5 cm incluindo as pernas, tem seis olhos dispostos em pares em forma de semicírculo e a superfície dorsal do cefalotórax apresenta um padrão característico no formato de um violino (Figura 1B) (P. H. da Silva et al. 2004). As aranhas marrons são sedentárias, não agressivas, têm hábito noturno e preferem áreas escuras. Em habitats humanos, as aranhas-marrons são frequentemente encontradas atrás de móveis, quadros e associadas a roupas.

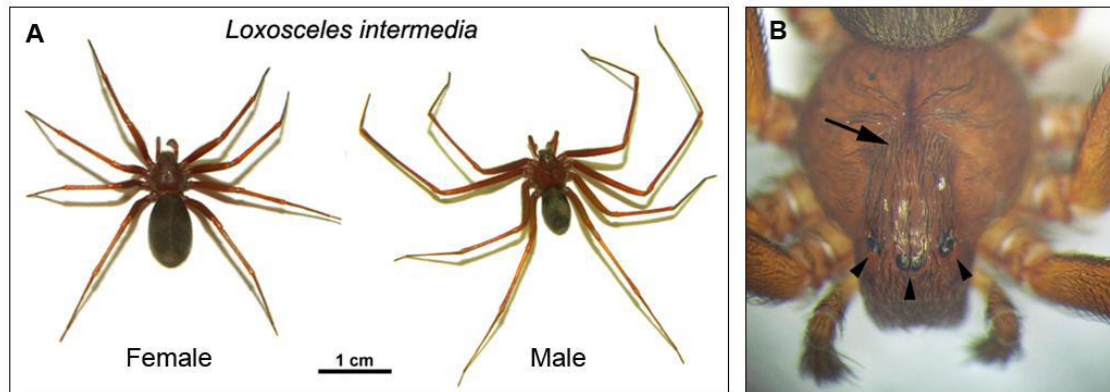


Figura 1 Morfologia da aranha *Loxosceles intermedia*. A) Dimorfismo sexual entre os espécimes de ambos os sexos de *L. intermedia*. B) A seta indica a figura de um violino no dorso do cefalotórax e o grupo de 3 setas aponta para o arranjo dos olhos em formato de semicírculo. Fonte: (P. H. da Silva et al. 2004)

O veneno de aranhas *Loxosceles* é uma mistura complexa de proteínas com várias massas moleculares, mas com uma predominância de proteínas num intervalo de 3 a 40 kDa (Ribeiro et al. 2007). Até o momento, diversas moléculas purificadas de vários venenos brutos de aranhas do gênero foram descritas, tais como nucleosídeos sulfatados (Schroeder et al. 2008), fosfatase alcalina, 5'-fosfo ribonucleotídeo, fosfolipases-D (Futrell 1992), metaloproteases, serino-proteases, toxinas inseticidas (De Castro et al. 2004) e hialuronidase (Futrell 1992; Young and Pincus 2000). Além destes, outros componentes de baixo peso molecular, como peptídeos neurotóxicos e não neurotóxicos, poliaminas são pouco estudados (Schroeder et al. 2008).

A análise do transcriptoma, da glândula venenífera da *Loxosceles intermedia*, obtido por Expressed Sequence Tag (*EST*)(Figura 2), revelou a presença de diversos componentes, altamente expressos, com notória atividade no envenenamento de mamíferos tais como fosfolipase D e metaloprotease (Gremski et al. 2010).

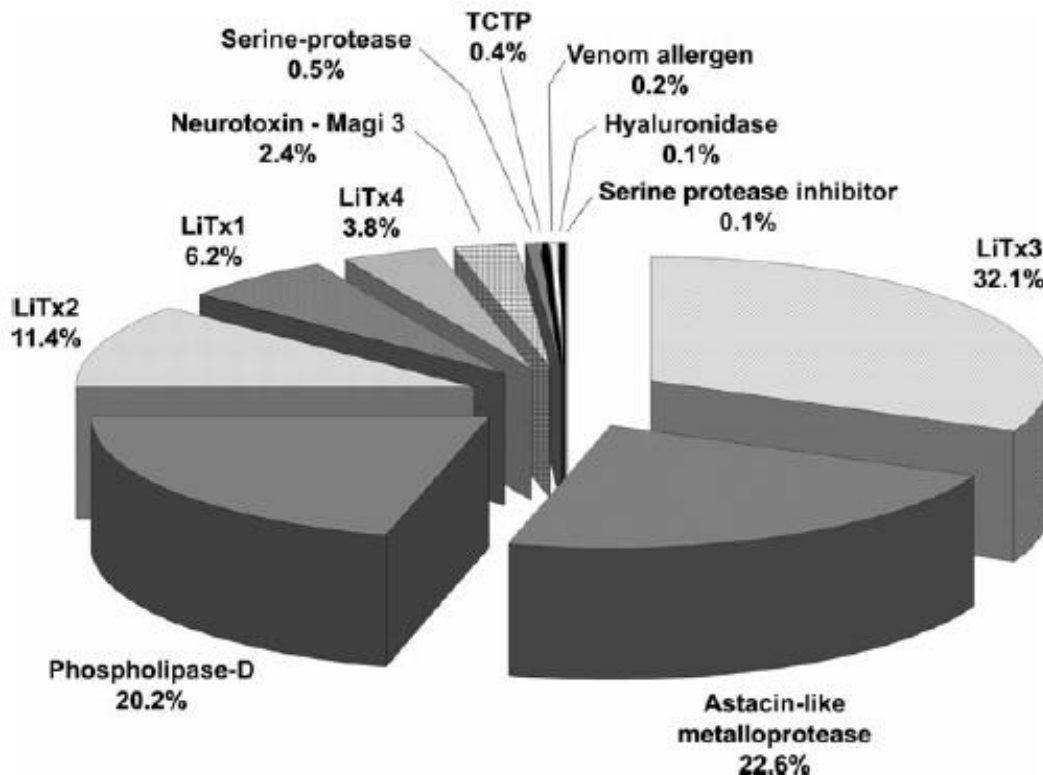


Figura 2 Proporções relativas de cada grupo de toxina sobre o total de transcritos codificadores de toxinas obtidos por Expressed Sequence Tag (EST) . Fonte: (Gremski et al. 2010)

Um grupo de proteínas relacionadas de 32 -35 kDa tem sido descrito como o principal componente tóxico do veneno de *Loxosceles* e está relacionada com a dermonecrose e atividades letais como insuficiência renal aguda. Além disso, demonstrou ser indutor de atividades hemolíticas mediadas via complemento (Tambourgi et al. 2005). Tal grupo de proteínas possui atividade de esfingomielinase (Smase D), enzimas que catalisam a hidrólise de esfingomielina, presente em membranas celulares, gerando fosforilcolina e ceramida 1-fosfato, este último um mediador de apoptose (Gangoiti et al. 2008) e potente mediador pró-inflamatório (Rivera et al. 2015).

Um componente dermonecrótico expresso nas glândulas veneníferas da *L. intermedia* denominado LiD1, pertencente à família de proteínas com atividade dermonecrótica, foi identificado e caracterizado molecularmente (Kalapothakis et al. 2002).

A partir de uma biblioteca de cDNA construída das glândulas veneníferas da aranha, a sequência de aminoácidos deduzida do cDNA revelou uma proteína madura de aproximadamente 31 kDa e pI 7,37. A proteína recombinante oriunda da LiD1 foi clonada e expressa, resultando na proteína recombinante rLiD1 de 32 kDa (Kalapothakis et al. 2002).

A proteína recombinante rLiD1, reconhecida por anticorpos anti-dermonecróticos, é também capaz de gerar anticorpos reativos contra proteínas dermonecróticas isoladas do veneno de *L. intermedia* (Kalapothakis et al. 2002) e, assim foi utilizada em estudos de produção de anticorpos monoclonais e policlonais concebidos para incrementar a imunoterapia do loxoscelismo.

1.3 Imunoglobulinas, Li mAb(7) e proteína químera rCpLi

Todos os anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas betas e consistem de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) idênticas entre si. As cadeias leves e pesadas estão conectadas por ligações não covalentes e pontes dissulfeto e formam os braços de uma estrutura em Y. Cada braço é denominado Fab (*Fragment antibody binding*) (G M Edelman 1962).

Na região aminoterminal, o Fab é composto por dois domínios variáveis VH na cadeia pesada e VL na leve formando a região Fv (*fragments variables*) e dois domínios constantes CH1 e CL (Putnam et al. 1979). Dentro da região variável existem seis alças hipervariáveis (Wu and Kabat 1970), três nos segmentos VH e três nos VL, designados regiões determinantes de complementaridade (CDR's) ou hipervariáveis. As regiões entre as regiões hipervariáveis, que compreendem o resto do domínio V, são formados por folhas β conservadas denominadas regiões estruturais ou *framework regions*. Existem quatro destas em cada domínio

V, designadas FR1, FR2, FR3, e FR4 (Sela-Culang, Kunik, and Ofran 2013).

O modo como os domínios variáveis enovelam e como as alças hipervariáveis se aproximam criam o local de ligação do anticorpo ou paratopo (Fig.2).

As regiões constantes (C) carboxiterminal formada por dois domínios adicionais da cadeia pesada, CH2 e CH3 compõem o Fc (*fragment crystallizable*) que possuem função efetora. As classes das moléculas dos anticorpos são divididas com base nas diferenças estruturais das regiões C das cadeias pesadas (Wang et al. 2007).

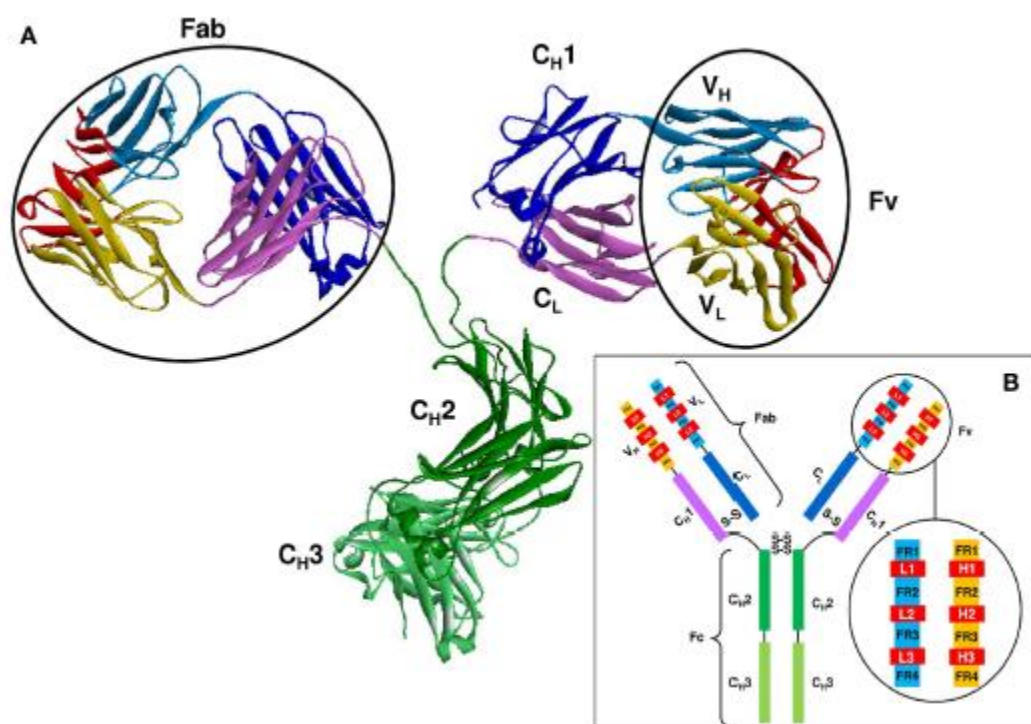


Figura 3 Representação esquemática da estrutura de uma molécula de anticorpo. A) Estrutura 3D de uma molécula de anticorpo (PDB ID:1IGT) B) Representação esquemática. Fonte: (Sela-Culang, Kunik, and Ofran 2013)

A especificidade conferida às imunoglobulinas devido à sua estrutura tridimensional as tornam poderosas ferramentas de

reconhecimento e de ligação que o sistema imune emprega para identificar e eliminar moléculas estranhas (Harrison et al. 2011).

A obtenção de soros antivenenos a partir da imunização de cavalos com venenos brutos é um exemplo da utilização de anticorpos em tratamentos específicos contra picadas de animais peçonhentos. No entanto, sua produção apresenta algumas limitações como, por exemplo: a eficácia neutralizante dos soros devido à produção de anticorpos contra agentes antigênicos naturais bem como moléculas inócuas do veneno (Harrison et al. 2011).

Por isso, é de suma relevância a utilização de novas tecnologias para buscar e produzir imunógenos alternativos a serem utilizados na imunização dos animais como: peptídeos sintéticos atóxicos mimetizando epitopos neutralizantes das principais toxinas de cada veneno ou ainda a produção de anticorpos neutralizantes com mínima utilização de animais. Para o desenvolvimento destas novas alternativas de modo eficaz, é importante obter informações sobre a estrutura e antigenicidade das principais proteínas presentes no veneno, bem como as propriedades dos anticorpos originados contra àquelas (Calderon-Aranda, Olamendi-Portugal, and Possani 1995).

Baseado no exposto acima e na menor eficácia do soro antiaracnídeo em neutralizar as atividades letais e dermonecróticas do veneno de *L. intermedia*, um grupo de 13 anticorpos monoclonais (mAbs) foram produzidos contra o veneno bruto de *L. intermedia* a fim de serem investigados sobre a possibilidade de utilizá-los no tratamento de picadas de *Loxosceles* no Brasil e ajudar a compreender sobre a especificidade antigênica das moléculas dermonecróticas e seus mecanismos de neutralização (Alvarenga et al. 2003).

Todos os 13 mAbs produzidos foram reativos contra proteínas de 32-35 kDa das quais correspondem a família de fatores dermonecróticos (DNF), mas apenas o anticorpo monoclonal Li mAb(7) foi bem caracterizado e demonstrou elevado potencial neutralizante da atividade dermonecrótica do veneno de *L. intermedia* e não apresentou nenhuma reação cruzada com venenos de *L. laeta* (Brasil), *L. laeta* (Peru) e *L. gaúcho*. Isso permite concluir que este anticorpo reconhece um epitopo específico do veneno de *L. intermedia* (Alvarenga et al. 2003). Li mAb(7) também reconhece a rLiD1 (Kalapothakis et al. 2002). Sua alta especificidade e ação neutralizante o torna útil para a identificação e produção de peptídeos neutralizantes e estudos de estrutura-função das Smases D (Alvarenga et al. 2003).

Para compreender sobre a especificidade antigênica das moléculas dermonecróticas e seus mecanismos de neutralização é necessário mapear os epitopos reconhecidos pelo Li mAb(7), para tanto o método de escaneamento de peptídeo foi aplicado. Duas séries de peptídeos ligados à membrana (15-mer e 25-mer), cobrindo toda a sequência de LiD1 foram testadas com Li mAb(7) e nenhuma ligação foi alcançada. Este resultado sugeriu que o epitopo reconhecido pelo Li mAb(7) é descontínuo ou conformacional, portanto, composto por vários resíduos que estão separados na sequência, mas espacialmente próximos na estrutura 3D da LiD1. Então, pela técnica de Phage display, bibliotecas de fagos filamentosos foram utilizados para identificar peptídeos que mimetizam componentes descontínuos de um epitopo (mimotopo) e, assim identificou-se quatro mimotopos QDEERVSSCPKVAWTFC, NCNKNDHLFACW, ECKSDWMPPYCP e ECTQKYDWLFCM, que não possuíam nenhuma similitude entre suas sequência e àquela de rLiD1. Então, a partir da associação da ferramenta de bioinformática MIMOP e imunoenaios

constatou-se que Li mAb(7) era capaz de se ligar apenas ao mimotopo NCNKNDHLFACW (de Moura et al. 2011).

Para caracterizar os epitopos associados com anticorpos protetores, 87 peptídeos de 15-mer em janela de 3 foram produzidos cobrindo a sequência completa de rLiD1. Por meio da associação de técnicas de modelagem molecular, síntese de peptídeos em membrana de celulose e imunoenaios uma região antigênica na porção N-terminal, NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP (L Felicori et al. 2006) foi identificada como um epitopo contínuo utilizando anti-rLiD1 de camundongo. Outra região antigênica foi determinada a partir da síntese de 90 peptídeos de 15 aminoácidos em janela de 3, percorrendo toda estrutura da rLiD1. Os spots reativos foram identificados por anticorpos policlonais anti-rLiD1 de coelho e antiveneno de *L.intermedia* de cavalo. Da análise da membrana de Spot Synthesis identificou-se o epitopo CYGSKKYENFNDFLKGLR (Liza Felicori et al. 2009).

Ainda perseguindo a proposta de produção de uma nova geração de soros terapêuticos ou vacinas contra venenos de aranhas *Loxosceles*, outra estratégia foi empregada, a utilização de antígenos sintéticos e não tóxicos.

Várias razões justificam o uso de peptídeos no lugar de proteínas inteiras para a produção de antivenenos: 1 - formulações de peptídeos não são nocivas para os animais imunizados, 2 - a apresentação de proteínas quiméricas composta por epitopos de LiD1 para o sistema imune pode aumentar o sucesso do protocolo de imunização e 3 - a produção de peptídeos desenhados é mais fácil que procurar e preparar a partir de venenos de aranhas (Mendes et al. 2013).

Para aumentar o sucesso desta alternativa uma proteína recombinante quimérica multiepitópica foi desenhada e denominada rCpLi (Mendes et al. 2013). A proteína foi construída a partir da combinação de três epítopos previamente determinados, dois lineares identificados utilizando anticorpos produzidos pela imunização de toxinas nativas ou recombinantes de Smases D e um conformacional (Mendes et al. 2013).

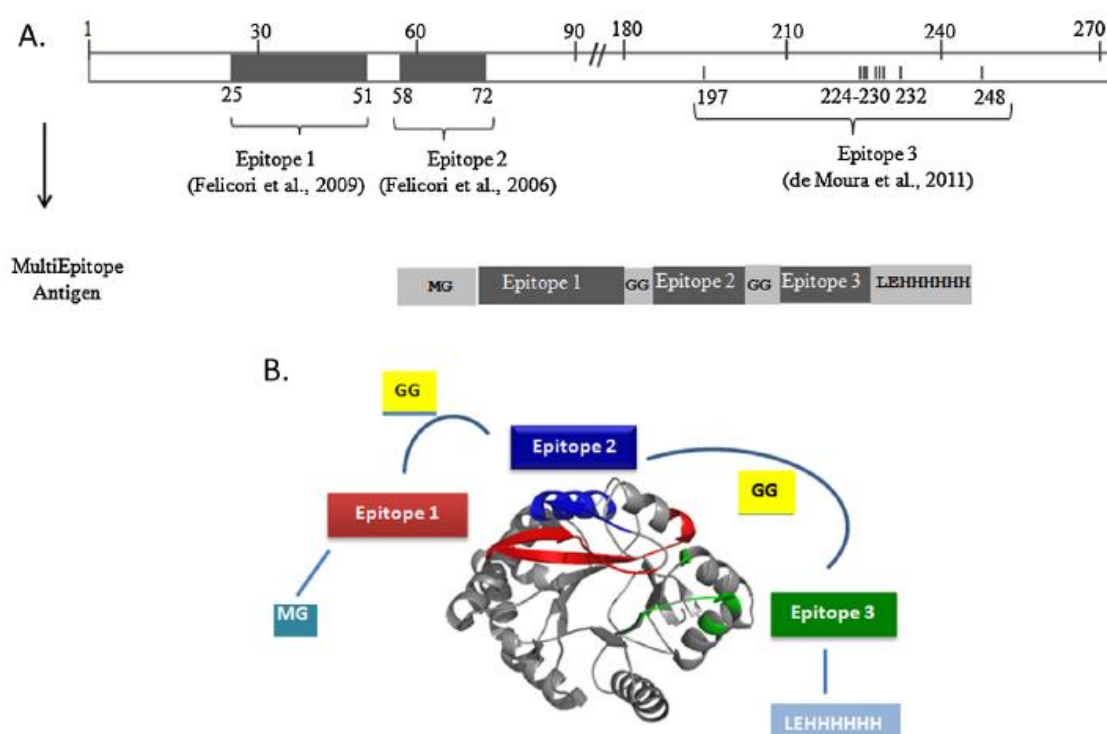


Figura 4 Proteína quimera recombinante rCpLi de *Loxosceles intermedia*. A) Esquema da sequência de LiD1 mostrando a posição dos três epítopos mapeados previamente e o antígeno multiepitopo que apresenta três epítopos. Epítopo 1, sequência NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP está presente na posição 25-51(L Felicori et al. 2006). Epítopo 2, sequência CYGSKKYENFNDFLKGLR na posição 58-72 (Liza Felicori et al. 2009) e por último o epítopo descontínuo 3 NCKNDHDLFACW localizado próximo ao C-terminal da LiD1. Estes três segmentos foram ligados por pequenos espaçadores GG. B) Localização dos epítopos usados para a construção da proteína quimérica na estrutura 3D de LiD1. Fonte: (Mendes et al. 2013)

A imunização de coelhos (Mendes et al. 2013) e cavalos (Figueiredo et al. 2014) com a proteína quimera rCpLi induziu a produção de anticorpos anti-rCpLi com efeitos protetores contra os efeitos tóxicos da rLiD1 e foram mais eficientes em neutralizar suas propriedades que os anticorpos produzidos contra epítopos individuais. Além disso, anticorpos

anti- *L. intermedia* reconheceram, mesmo que de forma moderada, a proteína quimérica (Mendes et al. 2013). Por isso, a rCpLi foi também selecionada para este estudo de mapeamento de paratopos do anticorpo monoclonal.

2. JUSTIFICATIVA

A via de produção dos antivenenos apresenta problemas a serem resolvidos. O primeiro trata-se da obtenção do veneno, que envolve a utilização de um grande número de aranhas, pois a quantidade de veneno produzida por indivíduo é diminuta, cerca de 4 μ L (Chaim et al. 2011). Segundo, os animais imunizados podem sofrer com a toxicidade, mimetizando quadro de envenenamento e diminuindo suas expectativas de vida e variabilidade intra e interindividual da capacidade neutralizante do soro.

Além disso, e em acordo com a tendência mundial, vários esforços têm sido realizados para a diminuição do uso e do sofrimento de animais como a criação de revistas como a ATLA – (Alternatives to Laboratory Animals) e comissões como o ECVAM – (European Committee for Validation of Alternative Methods) encarregados de promover e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição dos ensaios em animais (Kandárová and Letašiová 2011).

Portanto, a obtenção de moléculas sintéticas, por via da biotecnológica peptídica, com elevado potencial neutralizante dos efeitos tóxicos da *L. intermedia*, a partir do mapeamento do anticorpo monoclonal Li mAb(7), é relevante para num futuro reduzir a utilização de aranhas e cavalos na produção de soro antiaracnídeos e também contribuir para o

aumento da sensibilidade e ou seletividade de imunoenaios para diagnóstico.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Obter moléculas sintéticas por via da biotecnológica peptídica que possuam ação neutralizante da principal proteína com atividade dermonecrótica do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* a partir da identificação e caracterização dos resíduos que compõem o paratopo do anticorpo monoclonal Li mAb(7).

3.2 Específicos

- Identificar as regiões determinantes de complementariedade
- Determinar a estrutura terciária do Fv do anticorpo.
- Predizer a interação antígeno-anticorpo por modelagem bioinformática
- Identificar os possíveis resíduos do paratopo de Li mAb(7) que interagem com o fator dermonecrótico da *L. intermedia*.
- Mapear os resíduos dos paratopos utilizando ferramentas de bioinformática
- Sintetizar os peptídeos identificados em membrana de celulose.
- Confirmar os resíduos identificados através da realização de imunoenensaio das membranas de celulose
- Sintetizar os peptídeos solúveis que reagiram mais intensamente com a quimera rCpLi e com a rLiD1
- Avaliar a capacidade neutralizante dos peptídeos frente à atividade de esfingomielinase da rLiD1 por meio de ensaio “*in vitro*”.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Determinação da estrutura primária da região variável do anticorpo monoclonal Li mAb(7)

A estrutura primária da região variável do anticorpo Li mAb(7) foi determinada previamente pelo Laboratório de Imunoquímica de Proteínas da UFPR, coordenado pela Dra. Larissa Magalhães Alvarenga.

4.2 Identificação das regiões determinantes de complementariedade e predição da estrutura terciária do Fv do anticorpo

Após a inserção da estrutura primária da cadeia pesada e leve da região variável do anticorpo Li mAb(7), o programa acessível em <http://rosie.graylab.jhu.edu> (Lyskov et al. 2013; Almagro et al. 2011; Sivasubramanian et al. 2009) disponibiliza a estrutura terciária da região variável (Fv) e a localização das CDR's, de acordo com descrito abaixo (Kabat et al. 1984; Chothia and Lesk 1987):

CDR-L1

Inicia aproximadamente após 24 resíduos.

Resíduo antecedente é uma cisteína.

Resíduo procedente é um triptofano. Tipicamente Trp-Tyr-Gln, mas também, pode ser Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu.

Comprimento: 10 a 17 resíduos.

CDR-L2

Inicia no 16º resíduo após o fim de L1.

Resíduos antecedentes em geral são Ile-Tyr, mas também podem ser Val-Tir, Ile-Lis ou Ile-Phe.

Comprimento sete resíduos.

CDR-L3

Inicia no 33º resíduo após o final de L2.

Resíduo antecedente é uma cisteína.

Resíduos procedentes sempre Phe-Gly-XXX-Gly.

Comprimento 7 a 11 resíduos.

CDR-H1

Inicia aproximadamente no 26º resíduo, 4 após a cisteína.

Resíduos antecedentes são Cys-XXX-XXX-XXX.

Resíduo procedente é triptofano.

Comprimento 10 a 12 resíduos.

CDR-H2

Inicia 15 resíduos após o final de CDR-H1.

Resíduos antecedentes tipicamente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, mas é possível também um número de variações.

Resíduos procedentes podem ser Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala.

Comprimento 16 a 19 resíduos.

CDR-H3

Inicia 33 resíduos após o final de CDR-H2 (2 após a Cys).

Resíduos antecedentes Cys-XXX-XXX (tipicamente Cys-Ala-Arg).

Resíduos procedentes Trp-Gly-XXX-Gly.

Comprimento 3 a 25 resíduos.

4.3 Determinação *in silico* da interação antígeno-anticorpo e identificação dos possíveis resíduos que interagem com a rLiD1, por bioinformática

4.3.1 Identificação dos resíduos de aminoácidos que participam da estrutura antígeno-anticorpo

Duas plataformas foram selecionadas para prever a interação entre as estruturas do antígeno e do anticorpo: GRAMM-X (Floudas 2007) e Z-DOCK (Fang et al. 2012). Para cada programa, após a inserção da

estrutura primária do antígeno (rLiD1) (L Felicori et al. 2006) e do fragmento variável do anticorpo foram geradas, no modo automático, 10 possíveis estruturas. Em seguida, utilizando-se o software Swiss PBD Viewer, as predições de cada software foram analisadas. Os resíduos da rLid foram selecionados e padronizou-se que a distância máxima dos aminoácidos do anticorpo deveria ser no máximo de 4,0 Å (Nikoloudis, Pitts, and Saldanha 2014) em relação ao antígeno. Assim, foram removidos os resíduos do anticorpo que possuíam entre si uma distância superior a tal valor.

Então, as estruturas residuais do complexo foram analisadas novamente e todos os aminoácidos do antígeno foram removidos. Por fim, a composição de aminoácidos da região do anticorpo que participa da interação com o antígeno estava definida, porém com os segmentos separados. Com os fragmentos definidos, a distância entre os aminoácidos foi medida para definir dando-se a preferência para a união do segmento que se encontrava mais próximo. Para conferir flexibilidade à estrutura primária, permitir seu enovelamento e surgimento de possível estrutura conformacional, foram selecionadas glicinas, devido à sua cadeia lateral pouco volumoso, como conectores/espaçadores para ligar os fragmentos de aminoácidos.

A partir da modelagem por bioinformática, somente as cinco estruturas de cada plataforma de menor energia, portanto complexos antígenos-anticorpos mais estáveis foram sintetizadas na membrana de celulose.

Para verificar a influência do grupo lateral na conformação e consequentemente na capacidade de ligação do peptídeo empregou-se como espaçadores e/ou conectores tanto a alanina quanto a glicina em duas sequências denominadas Z-DOCK 2 e 4.

Além disso, os aminoácidos restantes após o tratamento das vinte predições do complexo antígeno-anticorpo das plataformas GRAMM-X e Z-DOCK, das quais houve remoção dos resíduos que não participavam da interação, foram elencados em relação à frequência de aparecimento, gerando uma sequência de 38 aminoácidos, 13 da cadeia leve e 25 da cadeia pesada. A partir da classificação de maior regularidade de aparecimento, peptídeos contendo os 38 aminoácidos foram sintetizados, bem como peptídeos de 22, utilizando-se uma janela de 4 para percorrer toda a sequência.

Todas as combinações entre as regiões determinantes de complementariedade também foram propostas para síntese da seguinte maneira: o CDR-1L foi combinado com todos os CDR's da cadeia leve (CDR -2L e CDR-3L) e da cadeia pesada (CDR -1H, CDR-2H e CDR-3H). Na sequência, o CDR-2L associou-se ao restante dos CDR's da cadeia leve (CDR-3L) e da cadeia pesada. O mesmo processo combinatório foi executado para os demais CDR's, resultando em 15 peptídeos. A glicina foi utilizada para conectar os diversos CDR's e originar uma única cadeia.

A partir dos 38 aminoácidos mais frequentes previamente elencados, foram sintetizados peptídeos de 24 aminoácidos denominados biparatopos (Duarte et al. 2010). Para isso, fixaram-se onze resíduos de maior frequência da cadeia leve, a partir do n- para o c- terminal, então duas glicinas foram adicionadas para se conectaram a onze resíduos da cadeia pesada selecionados da porção c - para n-terminal. Para percorrer toda a cadeia pesada de 25 aminoácidos de maior frequência utilizou-se janela de 1.

O mesmo arranjo foi realizado mais 2 vezes de modo que todos os treze aminoácidos de maior frequência da cadeia leve foram combinados

com os da cadeia pesada, numa combinação bipolaratopo de onze resíduos de cada lado separado por duas glicinas.

4.3.2 Análise dos spots reativos de maior intensidade

Os spots reativos foram classificados de acordo com a intensidade da reação e os mais reativos foram selecionados e as estruturas primárias analisadas. Além disso, por meio de duas plataformas Clustal Omega e Clustal W2 (Van Noorden, Maher, and Nuzzo 2014) realizou-se o alinhamento dos peptídeos reativos ou não.

Por meio do aplicativo Weblogo (Crooks et al. 2004; Schneider and Stephens 1990) avaliou-se as frequências em que os resíduos apareciam. A altura máxima do aminoácido considerando o eixo Y é 4 bits e padronizou-se que 2 bits é uma frequência intermediária. A partir do logotipo gerado pelo Clustal Omega os aminoácidos que se enquadravam em tais características foram selecionados. Assim, 10 resíduos de frequência alta a intermediária contados da região n para c-terminal foram fixados, unidos por 2 glicinas a mais 10 aminoácidos contados da região n para c-terminal, gerando um peptídeo de 22-mer. Dessa forma o peptídeo possuía 2 segmentos de 10 conectados por glicinas. Para percorrer toda a sequência à direita das glicinas utilizou-se janela de 1. Posteriormente, todos os segmentos que estavam na porção c-terminal passaram para o n-terminal e vice e versa e foram denominados como invertidos.

Para o logotipo gerado a partir do alinhamento dos peptídeos reativos no software Clustal W2 os aminoácidos foram agrupados separadamente de acordo com a frequência, e se enquadravam em alta ou baixa. No entanto, os mesmos arranjos foram executados.

Além disso, qualquer peptídeo reativo da primeira membrana selecionado para ser reavaliado e que contivesse mais de 22 resíduos foi sintetizado em janelas 22,1 até que toda a estrutura fosse percorrida.

4.4 Síntese dos peptídeos em membrana de celulose

Para mapear os paratopos do Li mAb(7), optou-se pela síntese de peptídeos em membrana de celulose conforme (Laune et al. 2002).

Os aminoácidos são depositados com auxílio de um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto. A síntese múltipla foi realizada em sintetizador (MultiPep Automatic Spot synthesizer - Intavis), e o plano de distribuição dos aminoácidos bem como a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos foi definido em programa de computação específico do equipamento.

Os grupamentos hidroxilas livres sobre a membrana de celulose são utilizados como pontos de ancoragem para a síntese do peptídeo.

A síntese do peptídeo inicia-se pelo C-terminal do último aminoácido das sequências estabelecidas em cada ponto. Pela adição de piperidina (20% em DMF- dimetilformamida), as funções aminas são recuperadas por meio da desproteção do grupo ligado ao Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila).

Os aminoácidos são, em seguida, ativados por DIC/HOBT (diisopropilcarbodiimida/hidrobenzotriazol) e depositados sobre a membrana para reinício de outro ciclo. Cada aminoácido é depositado duas vezes por ciclo.

Ao final da síntese, os grupos laterais, inicialmente protegidos dos aminoácidos, são desprotegidos pela adição de ácido trifluoracético-

TFA associado a diclorometano e trietilsilano. Por último, os peptídeos encontram-se fixados de maneira covalente sobre a membrana. Na primeira membrana foram sintetizados peptídeos de diversos tamanhos e na segunda apenas peptídeos de 22 mer.

4.5 Imunoensaios

4.5.1 ELISA sanduíche e por competição

Para avaliar a especificidade dos peptídeos solúveis ensaios de ELISA sanduíche e por competição foram realizados.

No ELISA Sanduíche, duas microplacas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100 µL de uma solução contendo 5 µg/mL do peptídeo 607 e 642, separadamente diluídos em tampão bicarbonato de sódio/carbonato de sódio 62,5 mM pH 9,6. Após esse período, as placas foram lavadas quatro vezes com solução PBS-Tween 0,01% e bloqueadas com a solução PBS-Tween 0,01% contendo albumina bovina (1%) por uma hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas e a quimera rCpLi e rLiD1 foram testadas em quatro concentrações distintas 5, 10, 20 e 40 µg/mL diluídas em tampão de incubação (PBS-Tween 0,01%, albumina bovina 0,1%) por 1 hora a 37°C. Em seguida foram adicionados os anticorpos secundários (anti-rCpLi de cavalo), no título 1:20000 diluídos em tampão de incubação por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas quatro vezes com solução PBS-Tween 0,01% e incubadas com 100 uL de IgG de ovelha anti- cavalo conjugado com a enzima peroxidase diluída 1:16000 em tampão de incubação por 1 hora a 37°C. A ligação do antígeno ao anticorpo monoclonal adsorvido na placa foi inferida utilizando-se ortofenilenodiamino (OPD) como substrato. Após 30 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20 em água deionizada. As absorbâncias foram lidas em 490 nm.

No ELISA por competição a microplaca foi sensibilizada *overnight* a 4°C, de maneira similar ao experimento anterior com uma solução contendo 5 µg/mL de rLiD1. Após esse período, as placas foram lavadas, bloqueadas. Os peptídeos 607 e 642 foram adicionados separadamente em quatro concentrações 5, 10, 20 e 40 µg/mL diluídos em tampão de incubação (PBS-Tween 0,01%, albumina bovina 0,1%) por 1 hora a 37°C. Em seguida, adicionou-se 100 µL de Li mAb(7) nas concentrações 0,01 e 0,005 µg/mL por 1 hora a 37°C. A detecção de reatividade foi feita utilizando-se IgG de cabra anti- camundongo conjugada com peroxidase (1:12000) e ortofenilenodiamino (OPD). Após 30 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico (1:20). As absorbâncias foram lidas em 490 nm. A competição entre os peptídeos e o anticorpo pelo antígeno adsorvido na placa foi expressa como percentual da reação sem competição.

4.5.2 Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana

As membranas contendo os peptídeos foram lavadas três vezes, com TBS (Salina, KCl 0,002M, Tris 0,05 M), pH 7,4, durante 10 minutos, e então saturadas com solução de bloqueio (3,0 g de sacarose, 1 g de albumina bovina em 50 ml de TBS- Tween 20 0,1% (TBS-T) durante a noite. Então, as membranas foram lavadas e incubadas com os antígenos rCpLi (5 µg/mL) e rLiD1 (10 µg/mL) por 60 minutos. As membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e incubadas por 60 minutos com anti-rCpLi de cavalo 1:20000 e 1:1000, respectivamente quando o antígeno era rCpLi (5 µg/mL) e rLiD1 (10 µg/mL). Após novas lavagens os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina (Sigma) (1:3000) foram adicionados por 1 hora. Após duas lavagens com TBS-T e com duas de CBS pH 7 (8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 2,1 g/L de ácido cítrico monohidratado) por 10

minutos cada adicionou-se o substrato (120 μ L MTT, 100 μ l BCIP, 80 μ L $MgCl_2$, q.s.p. para 20 ml de CBS) por 45 minutos.

Ao final dos ensaios as membranas foram submetidas à regeneração, para sua posterior reutilização. O tratamento consiste de três lavagens de 10 minutos com dimetilformamida, seguido por três lavagens de 2 minutos uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol, três lavagens de 10 minutos cada com uma solução com 10% ácido acético em etanol, e três lavagens de 10 minutos cada com metanol para secar a membrana. Este procedimento de regeneração permite o uso das membranas repetidas vezes (Frank 1992).

Todo o procedimento foi realizado sob agitação e em temperatura ambiente.

4.6 Síntese de peptídeos solúveis

Apenas dois peptídeos que reagiram mais intensamente no imunensaio de Spot synthesis e que possuíam motivos “conservados” foram sintetizados utilizando-se um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida, resina (SPPS), que usa aminoácidos especiais para síntese “*in vitro*”. Os aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à fase sólida que também se encontra protegida. O protocolo foi executado conforme (Merrifield 1969).

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

Para os peptídeos 607 e 642 foram colocados respectivamente 14,5 e 11,2 mg da resina (Rink Amide-40 μ M) em um tubo de síntese e o

seu grupamento Fmoc liberado com DMF por 30 minutos, após sua remoção adicionou-se 25% de piperidina em DMF por 5 minutos e numa segunda troca por mais 15 minutos. Então, a resina foi lavada três vezes por 30 segundos com DMF e uma vez por 30 segundos com DCM (Diclorometano). Em seguida é realizado o teste de Kaiser (Kaiser et al. 1970). Para tanto, deposita-se um pouco de resina num tubo de vidro, 100 µL de Reagente 1 (Ninhidrina 5% em etanol), 200 µL de Reagente 2 (Fenol 80% em etanol e 100 µL de Reagente 3 (KCN 0,001 M em piridina). Se aquece a 135°C por 3 minutos. O teste é baseado na reação da ninhidrina com amina primária, na qual gera uma cor azul escura indicando que o grupo está desprotegido.

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

O primeiro aminoácido de cada peptídeo foi posto no tubo de síntese adicionados de 500 µL de HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) e 30,3 µL e 23,4 µL de DIEA (Diisopropiletilamina), para o peptídeo 607 e 642 e incubados por 30 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Sequencialmente, o teste de Kaiser foi realizado, após 2 lavagens intercaladas de DMF e metanol, por 30 segundos cada, resultando em cor amarela indicando que o grupamento amino está protegido.

Caso a desproteção ou o acoplamento não ocorrerem de acordo com o esperado, as etapas para sua obtenção são repetidas quantas vezes for necessário. Ambos os segundos aminoácidos protegidos foram colocados nos tubos de síntese juntamente com HBTU e DIEA e

processado exatamente como o anterior. Este ciclo foi repetido até que todos os aminoácidos de ambos dos dois peptídeos estivessem acoplados.

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

As resinas novamente foram transferidas para as seringas onde ocorreu a síntese, drenadas e as soluções com os peptídeos recolhidas em 2 tubos. Os produtos foram precipitados com éter gelado overnight a 4°C. O tubo foi lavado e centrifugado três vezes a 5000 r.p.m por 20 minutos, enquanto o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspendido em solução de água e TFA 0,1%.

Os peptídeos obtidos foram então liofilizados e analisados em espectrômetro de massa.

4.7 Determinação de estrutura terciária dos peptídeos solúveis

Após a inserção da estrutura primária dos peptídeos 607 e 642, no programa acessível em <http://www.imtech.res.in/raghava/pepstr> (Kaur, Garg, and Raghava 2007) o mesmo disponibiliza a estrutura terciária de ambos os peptídeos.

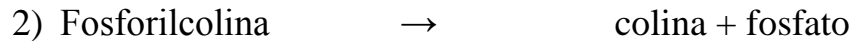
4.8 Neutralização da atividade de esfingomielinase “*in vitro*”

A avaliação da capacidade neutralizante dos peptídeos sobre a atividade de esfingomielinase foi realizada utilizando-se o produto Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit, InvitroGen que possui o seguinte princípio

Esfingomielinase D



Fosfatase alcalina



Colina oxidase



Peroxidase



O produto fluorescente possui absorção e emissão máxima em 571 e 585 nm.

O ensaio foi conduzido de acordo com as instruções de uso do fabricante, no qual os peptídeos 607 e 642 nas concentrações de 5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$ foram incubados por 50 minutos a 37°C com a proteína rLiD1 5 $\mu\text{g/mL}$.

A proteína rLiD1 representa 100 % de atividade de esfingomielinase, e portanto quanto maior a capacidade neutralizante dos peptídeos maior será a redução da atividade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sequenciamento da região Fv, identificação das regiões determinantes de complementariedade e determinação da estrutura terciária do Fv do anticorpo Li mAb(7)

Para determinar os resíduos que compõem as regiões determinantes de complementariedade e a estrutura terciária do Fv utilizamos o programa disponível em <http://rosie.graylab.jhu.edu>

Abaixo encontram-se delimitados em vermelho o CDR 1, azul o CDR 2 e em verde o CDR 3, tanto da cadeia leve quanto da pesada.

Cadeia leve do fragmento de ligação ao antígeno (Fab)

CDR1

DIVMTQSPSSLAVTAGEKVTMRC**KSSQSLWNVNENNYLS**WYQQ

CDR2

KQGQPPKLLIY**ASIRES**WVPDRFTGSGSGTDFNLTISNVHAEDLA

CDR3

VYYC**QHNHGSFLPYT**FGGGTKLEIK

Cadeia pesada do fragmento de ligação ao antígeno (Fab)

CDR1

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS**GYAFSSWMN**WVKQRPGQG

CDR2

LEWIG**RIYPGDGTNYNGKFKG**KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSV

CDR3

DSAVYFCAR**WTYGYSKYYYFDD**WGQGTTLTVS

As localizações de todas as CDR's estão em acordo com as regras propostas por (Lyskov et al. 2013) que realizaram análise de

estruturas obtidas por cristalografia das regiões Fv e Fab de anticorpos disponíveis no Protein Data Bank (PDB).

As regiões de estrutura ou *framework regions* formam as folhas β que fornecem o quadro estrutural do domínio, ao passo que as seis sequências hipervariáveis no CDR (L1, L2, L3, H1, H2 e H3) formam alças na borda externa do barril β , que são justapostos no domínio dobrado (Wang et al. 2007).

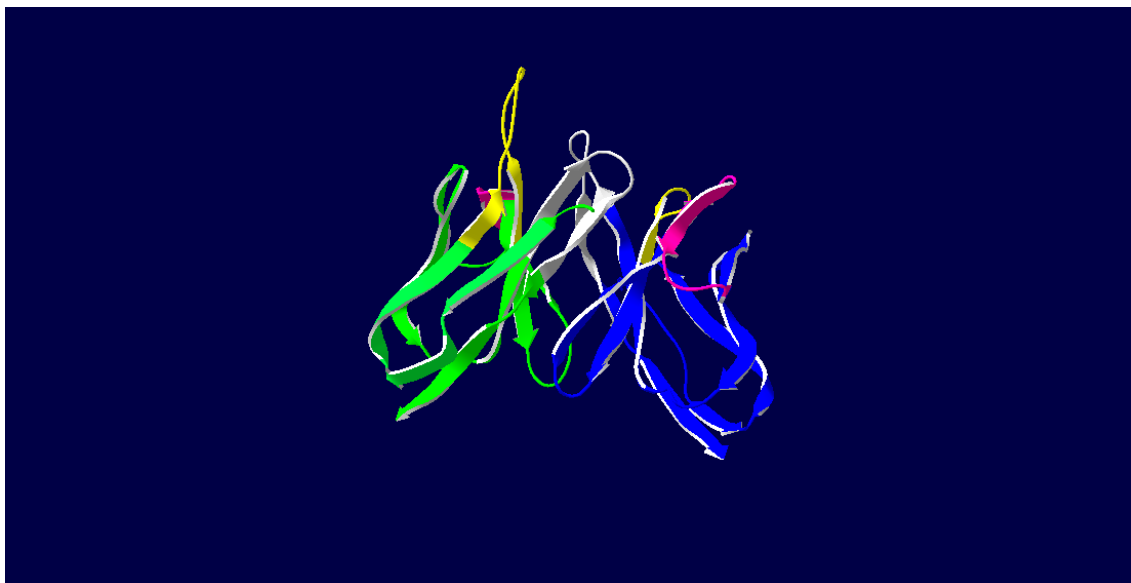


Figura 5 Estrutura terciária do Fv do anticorpo Li mAb(7). Em verde cadeia leve e azul cadeia pesada. Em amarelo, rosa e cinza as CDR's 1,2 e 3, respectivamente. Disponível em: <http://rosie.grayla.jhu.edu>

Na estrutura terciária obtida por bioinformática (Fig. 4), as regiões estruturais correspondem às folhas β antiparalelas em verde (cadeia leve) e azul (cadeia pesada). Os CDR's 1, 2 e 3 estão localizados nas alças representadas nas cores amarelo, rosa e cinza; respectivamente.

5.2 Determinação da interação antígeno-anticorpo e identificação dos possíveis resíduos de Li mAb(7) que interajam com rLiD1 por bioinformática

A partir de uma análise detalhada dos aminoácidos que fazem contato com o antígeno, (MacCallum, Martin, and Thornton 1996), sugeriu

que os resíduos que interagem com o antígeno encontram-se frequentemente nas CDR's e dos quais estão localizados no centro de ligação ao antígeno, além disso, aminoácidos dentro das CDR's que não fazem contato são importantes para a manutenção da estrutura conformacional das alças hipervariáveis e não necessariamente do reconhecimento. Vários estudos demonstraram também que peptídeos lineares contendo um ou mais CDR's retém a especificidade de reconhecimento ao antígeno e ligam-se a eles (Ma et al. 2003; Mirick and Bradt 2004).

Na figura 6, está representada a interação antígeno-anticorpo, camada 1, utilizando o software GRAMM X. A proteína rLiD1 (rosa claro) possui atividade dermonecrótica e é reconhecida especificamente pelo anticorpo Li mAb(7) (Alvarenga et al. 2003) por meio das CDR's (amarelo, rosa e cinza), tanto da cadeia leve (verde) quanto da pesada (azul).



Figura 6 Interação entre rLiD1 e CDR's do anticorpo Li mAb(7). Camada 1 do software GRAMM-X representando a estrutura 3D da interação entre LiD1, em rosa claro, e componentes da região Fv do anticorpo Li mAb(7) em azul, verde, rosa, amarelo e cinza.

Cada software utilizado disponibilizou 10 possíveis estruturas de interação antígeno-anticorpo, no entanto, apenas as 5 mais estáveis foram selecionadas para propostas de síntese de peptídeo.

Os dez complexos antígeno-anticorpo, de cada software, foram analisados e após a remoção dos resíduos do anticorpo que se encontravam mais distantes que 4Å do antígeno restou segmentos de anticorpo. Os aminoácidos oriundos dos fragmentos foram alinhados conforme a sequência primária da cadeia leve e pesada do Fv do Li mAb(7) e constatado que os resíduos mais frequentes se localizavam dentro das CDR's ou muito próximos, considerando a estrutura primária.

Tabela 6 Resíduos (13) da cadeia leve do LimAb (7) participantes da interação antígeno-anticorpo, identificados a partir da análise das estruturas obtidas após a remoção dos aminoácidos do anticorpo mais distantes que 4 Å do antígeno.

Posição	A.A	ZDock 1	ZDock 2	ZDock 3	ZDock 4	ZDock 5	ZDock 6	ZDock 7	ZDock 8	ZDock 9	ZDock 10	Gramm 1	Gramm 2	Gramm 3	Gramm 4	Gramm 5	Gramm 6	Gramm 7	Gramm 8	Gramm 9	Gramm 10	Pontuação	Resíduo	
1	D														1								1	
2	I																						0	
3	V																						0	
4	M																						0	
5	T																						0	
6	Q																						0	
7	S																						0	
8	P																						0	
9	S																						0	
10	S																						0	
11	L																						0	
12	A																			1			1	
13	V																						0	
14	T																						0	
15	A																						0	
16	G																						0	
17	E																						0	
18	K																						0	
19	V																						0	
20	T																						0	
21	M																						0	
22	R																						0	
23	C																						0	
24	K																						0	
25	S																						0	
26	S																						0	
27	Q														1								1	
28	S														1								1	
29	L																						0	
30	L																						0	

31	W											1			1			1			4						
32	N							1														1					
33	V							1	1	1	1	1		1							1		7	V			
34	N			1				1	1		1	1									1		1		7	N	
35	E							1		1		1									1				4		
36	N	1		1				1	1	1	1	1		1							1				9	N	
37	N			1				1				1													3		
38	Y							1			1	1									1				4		
39	L							1																	1		
40	S																								0		
41	W																								0		
42	Y																								0		
43	Q																								0		
44	Q																								0		
45	K																							1		1	
46	Q																							1		1	
47	G																								0		
48	Q																				1					1	
49	P																									0	
50	P																									0	
51	K																									0	
52	L	1	1					1			1	1	1													6	L
53	L																									0	
54	I																									0	
55	Y	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1											13	Y
56	G			1	1			1																		3	
57	A			1				1																		2	
58	S			1		1		1		1	1	1														6	S
59	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							1					14	I
60	R		1			1	1	1	1	1	1	1	1	1												10	R
61	E	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1												12	E
62	S		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1												11	S
63	W		1		1	1	1		1	1	1	1	1	1							1					11	W
64	V		1		1	1	1			1																6	V

65	P		1			1			1				1								4	
66	D		1			1	1		1			1	1								6	D
67	R																				0	
68	F																				0	
69	T												1								1	
70	G							1													1	
71	S																				0	
72	G																				0	
73	S																				0	
74	G																				0	
75	T																				0	
76	D																				0	
77	F																				0	
78	N																				0	
79	L																				0	
80	T																				0	
81	I																				0	
82	S																				0	
83	N																				0	
84	V																				0	
85	H																				0	
86	A																				1	1
87	E																				1	1
88	D																				0	
89	L																				1	1
90	A																				0	
91	V																				0	
92	Y																				0	
93	Y																				0	
94	C																				0	
95	Q																				0	
96	H																				0	
97	N																				0	
98	H													1							1	2

Tabela 7 Resíduos (25) da cadeia pesada do LimAb(7) participantes da interação antígeno-anticorpo, identificados como a partir da análise das estruturas obtidas após a remoção dos aminoácidos do anticorpo mais distantes que 4 Å do antígeno.

Posição	A.A	ZDock 1	ZDock 2	ZDock 3	ZDock 4	ZDock 5	ZDock 6	ZDock 7	ZDock 8	ZDock 9	ZDock 10	Gramm 1	Gramm 2	Gramm 3	Gramm 4	Gramm 5	Gramm 6	Gramm 7	Gramm 8	Gramm 9	Gramm 10	Pontuação	Resíduo
1	Q				1	1	1			1	1	1	1	1		1		1	1			11	Q
2	V		1		1	1	1			1	1		1	1		1	1		1			11	V
3	Q																	1		1		2	
4	L																					0	
5	Q																	1		1		2	
6	Q																	1				1	
7	S																	1				1	
8	G																			1		1	
9	P																	1		1		2	
10	E																	1				1	
11	L																			1		1	
12	V																					0	
13	K																					0	
14	P																					0	
15	G																					0	
16	A																					0	
17	S																					0	
18	V																					0	
19	K																	1				1	
20	I																					0	
21	S																	1				1	
22	C																					0	
23	K															1		1				2	
24	A												1			1		1				3	
25	S												1			1		1				3	
26	G	1	1		1		1			1	1		1			1	1	1	1			11	G
27	Y			1	1		1			1			1	1		1	1	1	1		1	11	Y
28	A	1	1	1	1		1		1		1				1	1	1	1			1	13	A
29	F			1			1						1					1	1			5	
30	S	1		1	1			1	1		1	1				1			1		1	10	S

31	S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	S
32	S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	S
33	W	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	W
34	M																			0	
35	N																			0	
36	W																			0	
37	V																			0	
38	K																			0	
39	Q																	1		1	
40	R																	1		1	
41	P																	1		1	
42	G																	1		1	
43	Q																			0	
44	L																			0	
45	E																			0	
46	W																			0	
47	I																			0	
48	G																			0	
49	R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	
50	I																			0	
51	Y	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	Y
52	P		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
53	G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	G
54	D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	D
55	G																			1	2
56	D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	
57	T																			1	
58	N																			1	1
59	Y																			1	
60	N																			0	
61	G																			1	
62	K																			1	
63	F																			0	
64	K																			1	

95	C																				0		
96	A																					0	
97	R		1		1		1		1	1	1	1				1	1			1		11	R
98	W	1		1	1		1	1	1	1	1				1		1				1	11	W
99	T	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1		1							1	12	T
100	Y	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1		1	18	Y
101	G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1			1		1	16	G
102	Y	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1			1		16	Y
103	S	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1		1		1	1				1	14	S
104	K	1		1				1	1						1		1				1	8	K
105	Y	1	1	1				1		1	1	1		1			1					9	Y
106	Y	1		1													1				1	4	
107	Y	1	1	1	1	1				1	1	1		1	1							11	Y
108	F																					0	
109	D		1		1	1	1	1	1	1	1	1		1		1	1					12	D
110	D		1		1	1			1		1	1	1			1						8	D
111	W																					0	
112	G																					0	
113	Q																	1		1		2	
114	G																	1				1	
115	T																	1				1	
116	T																					0	
117	L																					0	
118	T																			1		1	
119	V																					0	

Legenda: Resíduos marcados de roxo correspondem ao CDR 1 da cadeia pesada

Resíduos marcados de laranjade correspondem ao CDR 3 da cadeia pesada

Escala gradual de rosa - frequência dos resíduos remanescentes após remoção de aminoácidos que parecem não participar da interação antígeno-anticorpo

Na cadeia leve, treze aminoácidos tiveram alta frequência de aparecimento: VNN (localizados dentro do CDR-1); LYWVD (próximos ao CDR-2) e SIREs (localizados dentro do CDR-2) (Tabela 6). Na cadeia pesada vinte e cinco resíduos se encontravam a uma distância menor ou igual que 4Å do antígeno: QV (localizados no n-terminal); GYASSSW (localizados dentro do CDR-1); YGD (localizados dentro do CDR-2); KR (localizados entre o CDR-2 e CDR-3); WTYGYSKYYDD (localizados dentro do CDR-3) (Tabela 7).

As nove estruturas tridimensionais restantes, quatro de GRAMM-X e cinco de Z-DOCK, não foram inseridas como figuras neste documento. Porém, na tabela 8 está descrito a sequência primária dos peptídeos resultantes da análise manual da interação antígeno-anticorpo após a retirada dos aminoácidos do anticorpo que se encontram mais distantes que 4Å entre si no complexo com glicinas e/ou alaninas inseridos como espaçadores e/ou conectores aos aminoácidos restantes do anticorpo.

Tabela 8 Sequência primária dos peptídeos resultante da análise manual da interação antígeno- anticorpo

DESCRIÇÃO	RESÍDUOS																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
ZDOCK 1	A	S	S	S	W	Y	G	D	D	R	G	G	W	T	Y	G	Y	S	K	Y	Y	Y	G	G	Y	E											
ZDOCK 2	S	S	A	A	V	D	D	R	T	G	G	Y	S	G	Y	G	Y	G	Y	I	R	E	S	W	V	P	D										
ZDOCK 2	S	S	G	G	V	D	D	R	T	G	G	Y	S	G	Y	G	Y	G	Y	I	R	E	S	W	V	P	D										
ZDOCK 2	S	S	G	A	V	D	D	R	T	G	G	Y	S	G	Y	G	Y	G	Y	I	R	E	S	W	V	P	D										
ZDOCK 3	N	E	G	N	G	S	Y	Y	Y	Y	K	S	Y	G	Y	T	W	G	G	S	S	A	S	G	K	G	P	G	D	Y							
ZDOCK 4	S	S	S	G	G	T	Y	G	Y	S	G	G	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	G	G	T	Y	G	Y	S	A	G	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	G	G	T	Y	G	Y	S	A	A	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	A	G	T	Y	G	Y	S	G	G	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	A	G	T	Y	G	Y	S	A	A	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	A	A	T	Y	G	Y	S	G	G	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	A	A	T	Y	G	Y	S	A	A	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 4	S	S	S	A	A	T	Y	G	Y	S	A	A	Y	Y	G	G	I	G	E	S	W	V	G	G	D	D	R	V	Q								
ZDOCK 5	Q	V	G	D	D	T	G	Y	G	G	Y	G	G	Y	G	G	S	I	R	E	S	W	V	P	D												
Gramm x-1	Q	G	G	S	S	Y	W	R	D	D	T	Y	G	G	Y	S	K	Y	G	G	Y	N	N	E	N	V	Y	G	S	I	R	G	G	S	W		
Gramm x-2	G	Y	G	G	Y	I	R	E	S	W	G	G	G	Q	V	G	G	A	S	G	Y	A	G	G	S	S	K										
Gramm x-3	Q	V	Y	G	G	Y	G	Y	S	Y	Y	D	G	E	S	W	V	P	D	R	I	Y	G	G	N	V											
Gramm x-4	S	Q	G	G	H	G	S	F	G	Y	G	S	A	T	L	G	T	D	G	D	G	G	W	W	Y	G	G	Y	G	P	G	K					
Gramm x-5	Q	V	G	Y	A	S	S	G	G	S	S	S	K	G	Y	G	G	G	Y	G	Y	S	G	G	G	D	D	G	G	W							

Sequência primária dos peptídeos, geradas pelos softwares GRAMM-X e Z-DOCK, após a retirada dos aminoácidos que se encontram mais distantes que 4Å no complexo antígeno anticorpo. Para conectar os segmentos de aminoácidos utilizou-se glicinas e/ou alanina como resíduos conectores/espaçadores

5.3 Mapeamento do paratopo – Membrana N°1

A construção de peptídeos baseada em: modelagem por bioinformática, combinação de CDR's, peptídeos de 22 aminoácidos fundamentados na frequência de seu aparecimento a partir da análise antígeno-anticorpo dos softwares GRAMM-X e Z-DOCK e construção de biparatopos resultou na síntese de 87 peptídeos em membrana de celulose (Tabela 9).

Para identificar quais são os peptídeos capazes de interagir com o antígeno contendo o epítipo conformacional, a membrana de celulose foi incubada com a quimera rCpLi 5µg/mL. Os spots reativos ou não foram analisados manualmente.



Figura 7 Membrana de celulose N°1 após revelação. A membrana N°1 foi ensaiada com quimera rCpLi 5 µg/mL e após a revelação os spots reativos tornam-se azulados e os não reativos permaneceram incolores.

Na Tabela 10, encontram-se apenas os spots que reagiram com maior intensidade. As possíveis sequências comuns e prováveis resíduos que compõem o paratopo do Li mAb(7) estão identificadas na cor rosa e azul.

A análise dos spots gerados da combinação de CDR's, 534, 538, 541 e 543, demonstrou que o CDR-2H precisa estar na posição c-terminal independente da composição do n-terminal. Além disso, observa-se que os resíduos relevantes para reconhecimento são ⁵⁴DGDT⁵⁷, localizados no CDR-2H. A presença dos mesmos resíduos no spot 529, oriundo da análise da interação antígeno- anticorpo da plataforma GRAMM-X, sugere fortemente que tais resíduos compõem o paratopo do Li mAb(7).

A observação das sequências primárias dos peptídeos que originaram os spots, oriundos do arranjo denominado biparatopo, demonstra que a sequência GXKR deve se localizar obrigatoriamente na porção c-terminal e possui resíduos que compõe o CDR-2H como a ⁵³G e ⁵⁴D. Outros aminoácidos que participam da sequência são ⁷³K e ⁹⁷R. A lisina 73 está localizada numa região estrutural entre o CDR-2H e 3H, no entanto, o CDR-2H possui duas lisinas, e, portanto este aminoácido da região estrutural poderia ser um resíduo relevante deste CDR. A arginina

da posição 97 está justaposta ao CDR-3H, e é essencial para o reconhecimento do antígeno e a sua ausência causa perda de resposta.

Além disso, percebe-se que a composição dos resíduos vizinhos à sequência $^{53}\text{GX}^{73}\text{K}^{97}\text{R}$ é relevante. Por exemplo, nota-se que na direção do c-terminal a ausência de uma lisina sete resíduos após a arginina torna o spot não reativo. No entanto, quando há SSWY (sequência presente no CDR-2H) a esquerda de $^{53}\text{GX}^{73}\text{K}^{97}\text{R}$ observa-se que a lisina próxima ao n-terminal é desnecessária. Talvez isso se deva a manutenção do caráter básico dos resíduos próximos ao que se considera o paratopo, necessário para a indução da estrutura do mesmo. A presença de SSWY aumentou a reatividade e, portanto, parece contribuir para a afinidade e não para a especificidade.

Tabela 10 Identificação de paratopos por Spot Synthesis membrana N°1

Descrição	Nº spot	Resíduos																																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Gramm x-2	527	G	Y	G	G	Y	I	R	E	S	W	G	G	G	Q	V	G	G	A	S	G	Y	A	G	G	S	S	K							
Gramm x-4	529	S	Q	G	G	H	G	S	F	G	Y	G	S	A	T	L	G	T	D	G	D	G	G	W	W	Y	G	G	Y	G	P	G	K		
CDR1L -CDR2 H	534	G	K	S	S	Q	S	L	L	W	N	V	N	E	N	N	Y	L	S	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G		
CDR2L -CDR2H	538	G	G	A	S	I	R	E	S	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G												
CDR3L -CDR2H	541	G	Q	H	N	H	G	S	F	L	P	Y	T	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G								
CDR1H -CDR2H	543	G	G	Y	A	F	S	S	S	W	M	N	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G									
Biparatopo	556	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y	Y										
	557	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y										
	558	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K										
	562	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	S	S	W	Y	G	D	K	R	W	T	Y										
	563	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	S	S	W	Y	G	D	K	R	W	T											
	564	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	A	S	S	S	W	Y	G	D	K	R	W										
	565	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	Y	A	S	S	S	W	Y	G	D	K	R										
	571	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	G	G	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y	Y										
	572	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y										
	573	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	G	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K										
	580	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	G	G	Y	A	S	S	S	W	Y	G	D	K	R										
	586	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	D	G	G	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y	Y										
587	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	D	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y											
588	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	V	D	G	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K											

Sequências primárias dos peptídeos que reagiram mais intensamente na membrana N°1. Após análise revelaram em azul e vermelho possíveis sequências e aminoácidos que compõem os paratopos do Li mAb(7)

As sequências dos spots reativos foram analisadas na ferramenta Weblogo <http://weblogo.threeplusone.com/>, que é um aplicativo baseado na web, projetado para criar logos. Tais logotipos são uma representação gráfica de alinhamentos múltiplos de sequências de aminoácidos ou de ácido nucleicos desenvolvidos por (Crooks et al. 2004; Schneider and Stephens 1990).

Cada logotipo consiste em pilhas de símbolos, uma pilha para cada posição na sequência. A altura total da pilha indica conservação da sequência nessa posição, enquanto que a altura dos resíduos no interior da pilha indica a frequência relativa de cada aminoácido nessa posição. Para a análise da membrana, os spots foram divididos em positivos e negativos, alinhados utilizando o programa Clustal Omega e W2 e os alinhamentos inseridos no programa Weblogo.

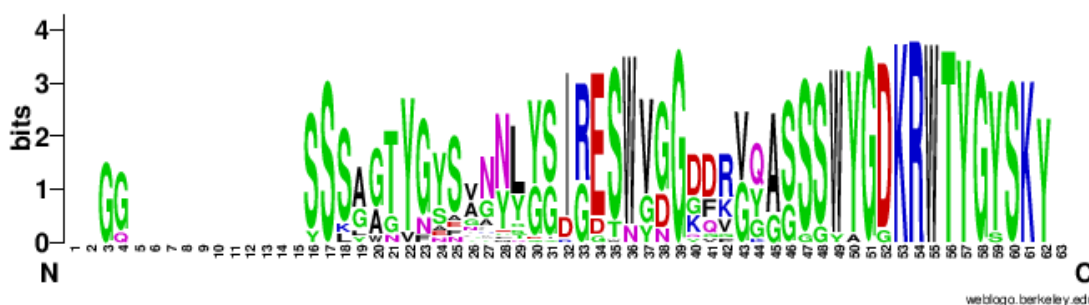


Figura 8 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos reativos com o software Clustal Omega. Logotipo criado utilizando o software Clustal Omega, originado do alinhamento das sequências primárias dos peptídeos que reagiram no imunoenensaio da membrana N°1.

A análise da figura 8 representa o logotipo dos spots reativos e demonstra que os resíduos ⁵³G ⁵⁵K e ⁵⁶R dentre outros como ⁴⁹SSWYXD⁵⁵ próximos ao c-terminal são os mais frequentes e conservados, estão em acordo com a análise manual previamente realizada, são componentes da cadeia pesada ou de algum de seus CDR's (principalmente CDR-2H) e são relevantes para a capacidade de reconhecimento do peptídeo. Na região próxima do n-terminal também há bastantes resíduos conservados e

frequentes, porém não são suficientes para induzir algum tipo de resposta frente à quimera rCpLi.

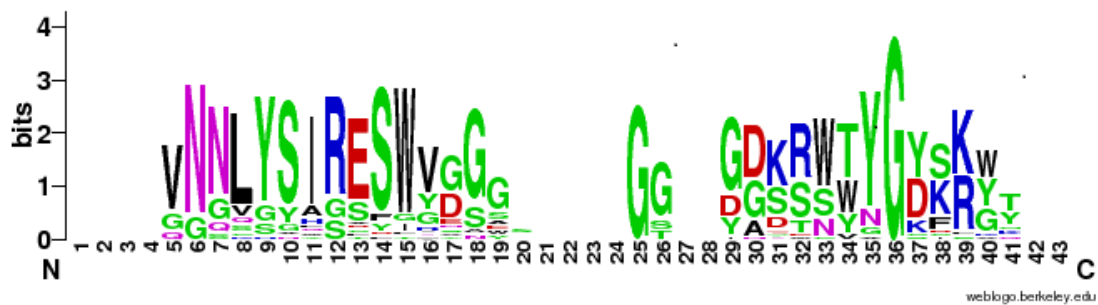


Figura 9 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos reativos com o software Clustal W2. Logotipo criado utilizando o software Clustal W2, originado do alinhamento das sequências primárias dos peptídeos que reagiram no imunoenensaio da membrana N°1.

A figura 9 demonstra que os resíduos G, K e R estão próximos à porção c-terminal, mas não estão em posições conservadas e não são tão frequentes, como observado no logotipo (Figura 8) oriundo do alinhamento no programa Clustal Omega. A porção n-terminal demonstrou possuir a sequência VNNLYSIRESW conservada e frequente em ambos os alinhamentos, no entanto, estes aminoácidos não são capazes de reconhecer o epítipo conformacional presente na quimera rCpLi.

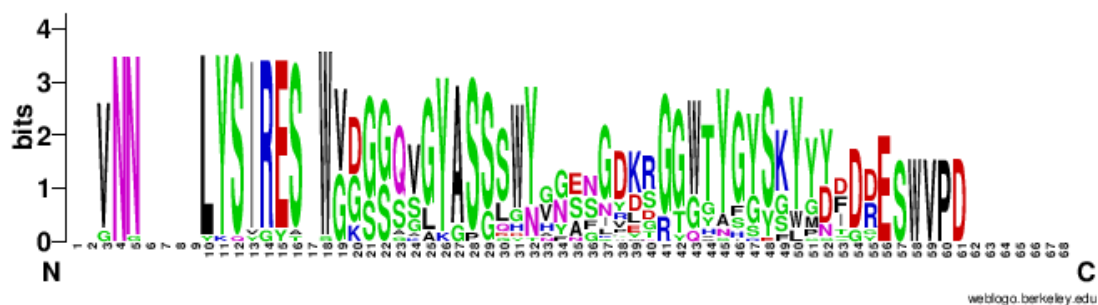


Figura 10 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos não reativos com o software Clustal Omega. Logotipo criado utilizando o software Clustal Omega, originado do alinhamento das sequências primárias dos peptídeos que não reagiram no imunoenensaio da membrana N°1.

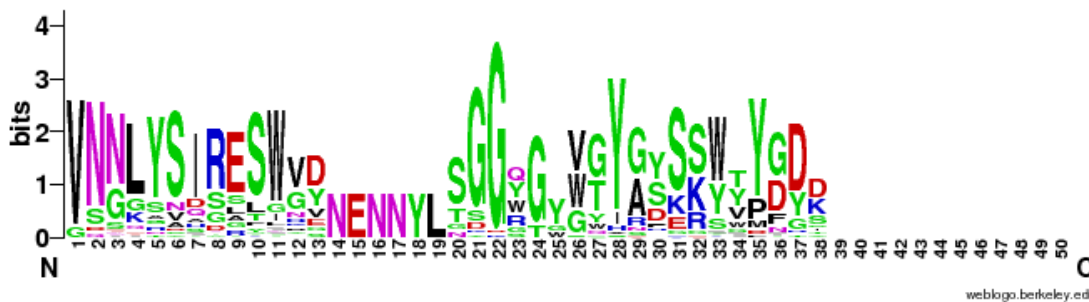


Figura 11 Logotipo obtido a partir do alinhamento dos peptídeos não reativos com o software Clustal W2. Logotipo criado utilizando o software Clustal W2, originado do alinhamento das sequências primárias dos peptídeos que não reagiram no imunoenensaio da membrana N^o1.

A análise do logotipo obtido a partir do alinhamento dos spots não reativos na membrana N^o1 utilizando o software Clustal Omega (Figura 10) demonstra que a porção n-terminal é mais conservada e os resíduos ³VNN⁵ e ¹⁰LYSIRESXW¹⁸ são os mais frequentes. Já o restante dos peptídeos, a partir da posição 19, não demonstra nenhum aminoácido de alta frequência. O mesmo padrão de frequência dos aminoácidos ¹VNNLYSIRESW¹¹ na porção n-terminal pode ser observada no logotipo obtido a partir do alinhamento dos spots não reativos com o software Clustal W2 (Figura 11). Os aminoácidos VNN estão presentes no CDR-1L, L e Y em regiões estruturais entre os CDR 1 e 2 da cadeia leve e SIRESXW no CDR-2L. Tal perfil indicam que apesar da frequência de aparecimento estes resíduos podem ser mais importantes para manutenção estrutural e função conformacional que de reconhecimento. Esta composição do n-terminal também é muito semelhante a dos spots reativos, porém posicionados de modo diferente, como pode ser observado nos logotipos obtidos a partir do alinhamento tanto com Clustal Omega quanto com Clustal W2. A observação do padrão de distribuição dos spots reativos confirma a conclusão que a porção c-terminal de caráter básico é de suma importância para o reconhecimento do antígeno.

5.4 Mapeamento do paratopo–Membrana N°2

A síntese da membrana número 2 foi baseada na análise das sequências reativas da membrana número 1 e frequência dos resíduos observada nos logotipos. Todos os 83 peptídeos possuem 22 aminoácidos.

Para identificar quais os peptídeos possuíam potencial neutralizante dos efeitos tóxicos dos fatores dermonecróticos, a membrana de celulose foi incubada com a quimera rCpLi (5µg/mL). Os spots reativos ou não foram analisados manualmente.



Figura 12 Membrana de celulose N° 2 após revelação. A membrana N°2 foi ensaiada com quimera rCpLi (5 µg/mL) e após a revelação os spots reativos tornam-se azulados e os não reativos permaneceram incolores.

Na tabela 11, encontram-se apenas os spots que reagiram com maior intensidade e foram identificadas as sequências comuns dentro de cada uma dessas regiões como possíveis resíduos que compõem o paratopo do Li mAb(7).

Tabela 11 Identificação de paratopos por Spot Synthesis membrana N°2

Descrição	Nº Spot	Resíduos																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Grammx-2 22,1	607	I	R	E	S	W	G	G	G	Q	V	G	G	A	S	G	Y	A	G	G	S	S	K
Grammx-2 22,2	618	G	S	A	T	L	G	T	D	G	D	G	G	W	W	Y	G	G	Y	G	P	G	K
Últimos 22 a.a CDR1L-CDR 2H	619	V	N	E	N	N	Y	L	S	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G
CDR2L -CDR2H (538)	621	G	G	A	S	I	R	E	S	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G
Últimos 22 a.a CDR3L-CDR 2H	622	H	G	S	F	L	P	Y	T	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G
Últimos 22 a.a CDR 1H-CDR2H	624	A	F	S	S	S	W	M	N	G	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G
562 (22,1)	631	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	S	S	W	Y	G	D	K	R	W	T
563 (22,1)	632	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	G	G	S	S	W	Y	G	D	K	R	W	T
	633	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	S	S	S	W	Y	G	D	K	R	W
564 (22,1)	634	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	A	S	S	S	W	Y	G	D	K	R
	635	V	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	G	G	S	S	S	W	Y	G	D	K	R	W
573 (22,1)	642	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	D	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K
Omega 2	661	A	N	L	Y	I	R	E	S	W	V	G	G	K	R	W	T	Y	G	Y	S	K	Y
W2 freq. intermediária	679	D	N	N	L	Y	S	I	R	E	S	W	G	G	S	S	S	W	Y	G	D	K	R

Sequências primárias dos peptídeos que reagiram mais intensamente na membrana N2°. Após análise revelaram em azul, verde e vermelho prováveis sequências e aminoácidos que compõem os paratopos do Li mAb(7).

O spot controle, de número 621, se trata da combinação de CDR-1H e 2H que na membrana 1 havia respondido à quimera rCpLi. O CDR-2H se encontra no c-terminal. Os demais spots que reagiram possuem sequências previamente observadas como $^{54}\text{DGDT}^{57}$ e $^{53}\text{G}^{73}\text{K}$ e ^{94}R .

A avaliação da membrana 2 permitiu determinar também que os resíduos GXXK no c-terminal são relevantes para a especificidade do peptídeo, pois na sequência 607 não está presente nem $^{54}\text{DGDT}^{57}$ nem $^{53}\text{G}^{73}\text{K}$ e ^{94}R , de importância previamente descrita. No peptídeo 618 $^{54}\text{DGDT}^{57}$ está distante do c-terminal, o que corrobora a importância dos resíduos GXXK. A ausência desta sequência determina perda de resposta mesmo quando $^{54}\text{DGDT}^{57}$ está presente, isso pode se dever tanto à sua proximidade do n-terminal, quanto à presença da lisina com sua carga negativa e a glicina conferindo flexibilidade à molécula e permitindo a aquisição de conformação adequada.

Os demais spots que reagiram possuem sequências previamente observadas $^{53}\text{G}^{73}\text{K}$ e ^{94}R e suas variações do lado n-terminal. Novamente, nos peptídeos 642 e 661 há o aparecimento dos resíduos GXXK que provavelmente são responsáveis pela resposta já que GDKR estão distantes do c-terminal.

Os peptídeos 607 e 642 foram produzidos na forma solúvel para testar se a sequência GXXK associada ou não a GDRK possui ação neutralizante da proteína rLiD1 e compete pelo mesmo sítio de ligação do anticorpo Li mAb(7).

É interessante citar, que ao reanalisar a membrana 1 notamos que a sequência GXXK está presente em vários peptídeos exceto nos 562 a 565 e 580, no qual se atribui sua reatividade à localização de GDRK no c-terminal. Dessa forma, novamente se comprova a importância da sequência

composta de uma glicina distante dois resíduos de uma lisina bem como sua localização no peptídeo.

5.5 Peptídeos solúveis

A partir da análise da segunda membrana, dois peptídeos foram sintetizados na forma solúvel. A seguir, encontram-se algumas de suas propriedades:

Peptídeo 607

Estrutura primária: IRESWGGGQVGGASGYAGGSSK

Estrutura terciária

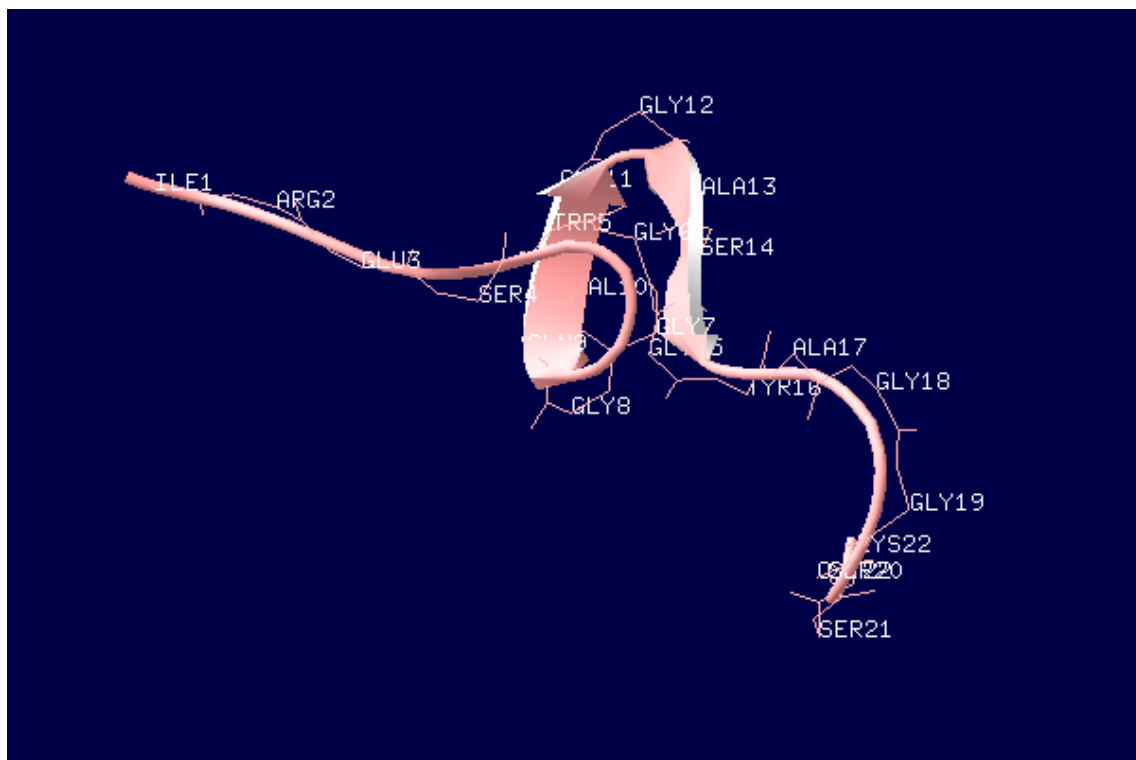


Figura 13 Estrutura terciária do peptídeo solúvel 607

Massa molecular: 2066,98 da ou 2,006698 kDa

Ponto isoelétrico: 8,59

Número total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu): 1

Número total de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys): 2

Índice de estabilidade: 40,54

Referência: GRAM X-2 Membrana 1 e 22,1 Membrana 2

Rendimento 2,0 mg

Peptídeo 642

Estrutura primária: NNLYSIRESWGGDKRWTYGYSK

Estrutura terciária:

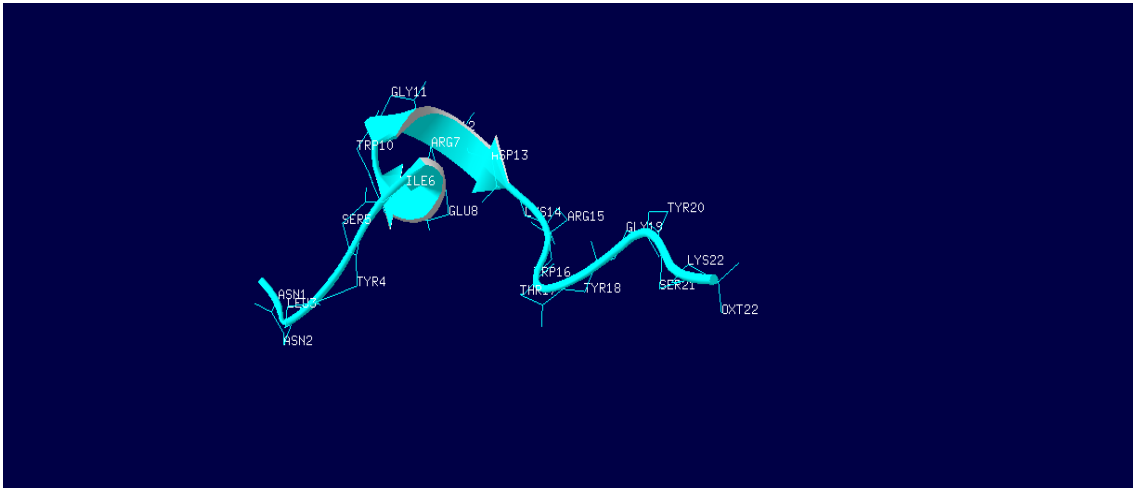


Figura 14 Estrutura terciária do peptídeo solúvel 642

Massa molecular: 2679,28 ou 2,67928 kDa

Ponto isoelétrico: 9,4

Número total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu): 2

Número total de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys): 4

Índice de estabilidade: 41,64

Referência: Sequência 573 Membrana 1 e 22,1 Membrana 2

Rendimento 2,4 mg

Os produtos da síntese foram analisados por espectrometria de massas e ambos os gráficos indicaram a presença de peptídeos com as massas esperadas.

A inserção de glicinas como conectores/espaçadores parece ter conferido flexibilidade a estrutura primária dos peptídeos pois a terciária determinada por: <http://www.imtech.res.in/raghava/pepstr> (Kaur, Garg, and Raghava 2007) previu a existência de folhas β anti-paralelas e alças

semelhantes à região do Fv de anticorpos (Sela-Culang, Kunik, and Ofran 2013). O modo como os peptídeos se enovelam é essencial para adquirirem a conformação do paratopo e se ligarem ao antígeno.

A análise do índice de estabilidade é usado para determinar se o peptídeo/ proteína é estável em ensaios em tubos. Se o índice for menor que 40 é provável que seja estável, se maior provavelmente será instável, portanto o peptídeo 642 é menos estável que o 607 (Guruprasad, Reddy, and Pandit 1990).

5.6 ELISA

5.6.1 ELISA Sanduíche - Antígeno quimera rCpLi e proteína rLiD1

Um ensaio de ELISA foi realizado para avaliar se os peptídeos 607 e 642 são capazes de reconhecer especificamente tanto a quimera rCpLi quanto a rLiD1. Ambos os antígenos foram testados nas concentrações de 5, 10; 20 e 40 µg/mL. A seguir, encontra-se o gráfico com os dados obtidos a partir da média e desvio padrão resultantes de duplicata em cada concentração.

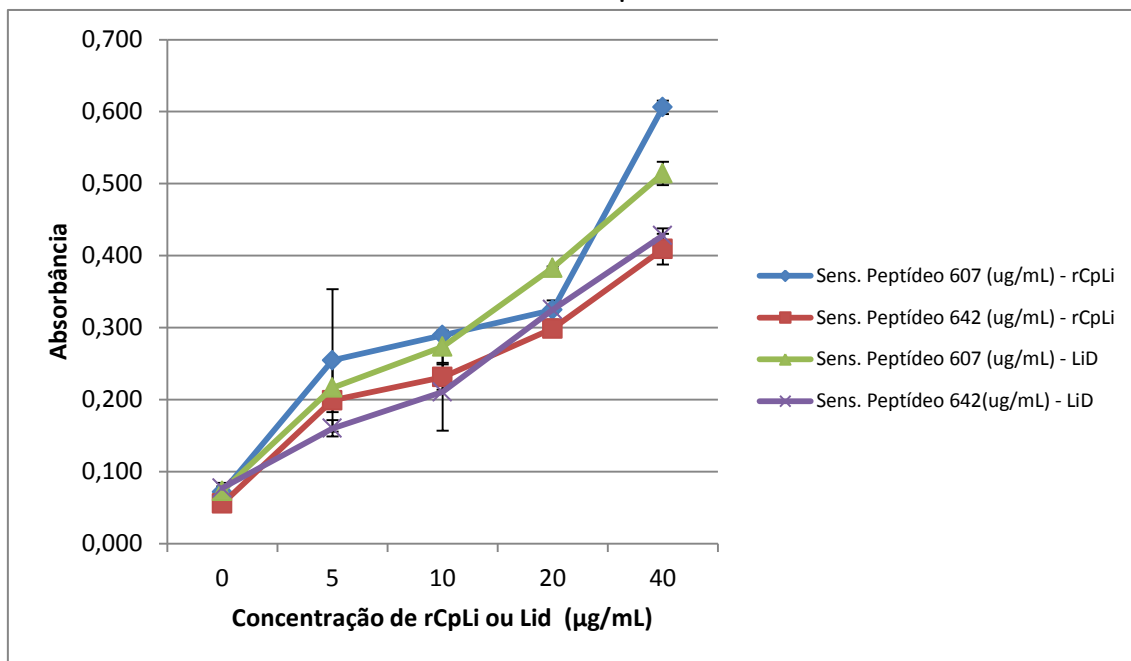


Figura 15 ELISA Sanduíche de ligação entre peptídeos (607 e 642) e rLiD1 e quimera rCpLi. Duas microplacas foram sensibilizadas, uma com peptídeo 607 e outra com 642 e ensaiadas com concentrações crescentes de rLiD1 e quimera rCpLi. Os pontos representam média \pm desvio padrão da absorbância em 490 nm.

À medida que se aumenta a concentração do antígeno observa-se uma elevação da resposta do sistema. Esse comportamento, tanto para os peptídeos (607 e 642) quanto para os antígenos (rLiD1 e rCpLi) demonstra a especificidade da ligação.

O peptídeo 607 apresentou absorbâncias mais elevadas que o 642, tanto para a quimera quanto para a rLiD1. Por exemplo, numa concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de rCpLi a média da absorbância do peptídeo 607 foi $0,290 \pm 0,011$ (média \pm desvio padrão) e do 642 foi $0,231 \pm 0,0003$. As absorbâncias do peptídeo 607 são 26% mais elevadas que as do peptídeo 642.

O peptídeo 642 se mostrou muito pouco solúvel em meio aquoso, o que pode se dever a sua instabilidade e perda de conformação, portanto a maior estabilidade do peptídeo 607 pode haver favorecido sua interação com o antígeno no meio selecionado e conseqüentemente incrementado o

reconhecimento e sua ligação Além disso, a presença de um trio e uma dupla de glicinas pode ter conferido maior flexibilidade à estrutura primária do peptídeo 607 e maior semelhança estrutural (Fig. 16) com a região Fv dos anticorpos devido à formação de alças e por conseguinte facilitado o reconhecimento do antígeno.

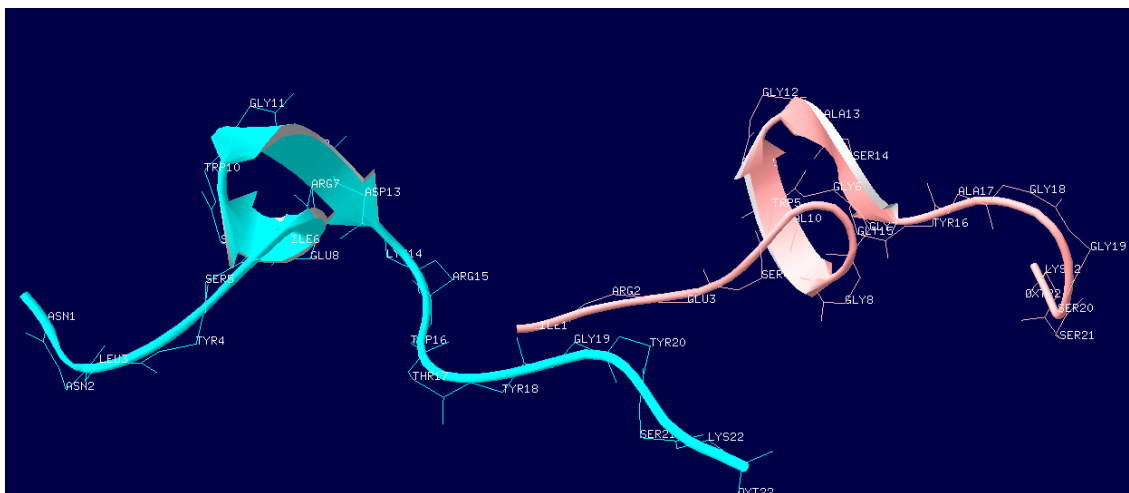


Figura 16 Estrutura terciária do peptídeo solúvel 642 (em azul) e peptídeo 607 (rosa), dispostos lado a lado.

Ambos os peptídeos parecem ter maior afinidade pela quimera do que pela rLid1, tal comportamento não foi observado em todas as concentrações ensaiadas dos antígenos. Para confirmar esta tendência o ensaio deveria ser repetido com um maior número de replicatas.

5.6.2 ELISA por competição

Para verificar se os peptídeos competem com o anticorpo Li mAb(7) pelo mesmo epitopo, realizou-se um ensaio de ELISA por competição. O resultado foi normalizado em relação ao controle positivo (somente o Li mAb(7)). A adição de peptídeo, caso haja competição pelo mesmo sítio de ligação, deve deslocar o anticorpo e reduzir a absorvância.

A seguir encontra-se o gráfico de percentual de ligação do Li mAb(7) obtidos a partir da duplicata das absorvâncias em cada concentração de peptídeo associado ou não Li mAb(7) 0,005 $\mu\text{g/mL}$.

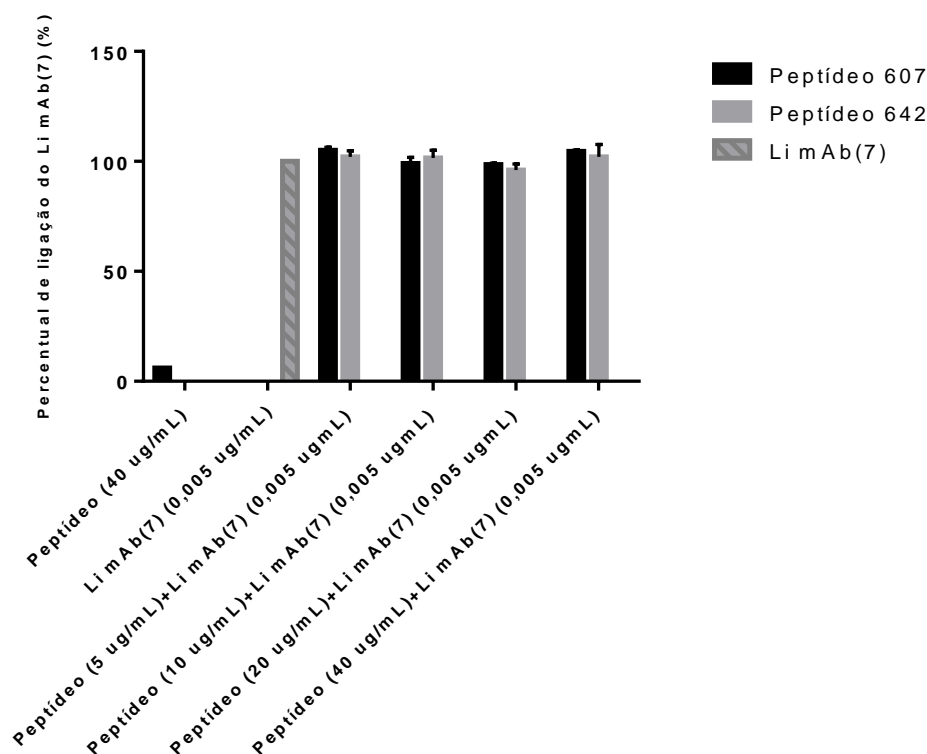


Figura 17 ELISA por competição entre Li mAb(7) e peptídeos (607 e 642). Li mAb(7) na concentração 0,005 $\mu\text{g/mL}$ foi incubado ou não com o peptídeos 607 ou 642 e sua capacidade de ligar-se ao antígeno foi determinada. Apenas Li mAb(7), representa o 100% de ligação enquanto apenas os peptídeos representam o 0% de ligação à rLiD1. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão.

O percentual de ligação dos peptídeos a rLiD1 é próximo de 0%, e está em acordo com o esperado para o modelo de revelação, demonstrando que não está ocorrendo ligação inespecífica entre o conjugado e o antígeno imobilizado. Ao adicionar primeiramente os peptídeos na placa, em concentrações crescentes, e depois o monoclonal não se observa redução do percentual de sua ligação já que as absorvâncias resultantes estão muito próximas àquela obtida exclusivamente com Li mAb(7). Como o anticorpo na concentração de 0,005 $\mu\text{g/mL}$, sozinho, é designado o 100% observa-se que a presença dos peptídeos nas

concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg/mL não interferem em sua capacidade de ligação.

A alta afinidade dos anticorpos é uma função do grau de complementariedade entre as moléculas que interagem e não é garantida apenas pela ligação de alguns resíduos importantes para o reconhecimento específico do antígeno (Mian, Bradwell, and Olson 1991). A magnitude da afinidade dos peptídeos pelo epitopo insuficiente para deslocar o Li mAb(7) pode explicar a ausência de competição. A constante de dissociação do anticorpo Li mAb(7) e dos peptídeos não foram determinadas, no entanto, sabe-se que a afinidade média da ligação entre antígeno e imunoglobulinas IgG tem um K_d entre 10^{-7} e 10^{-11} M, e anticorpos de muita alta afinidade $K_d 10^{-12}$ (Ramos-Vara and Miller 2014).

A possibilidade de uma coexistência de peptídeo e anticorpo se ligando a rLiD1 também não é descartada, visto que os peptídeos 607 e 642 possuem respectivamente, peso molecular de 2,00 e 2,68 kDa , muito pequenos se comparados a IgG 150 kDa (Chames et al. 2009).

5.7 Neutralização da atividade de esfingomielinase “*in vitro*”

Visto que os peptídeos se ligam de maneira específica a rLiD1, conforme constatado na Figura 15, conduziu-se um ensaio “*in vitro*” de neutralização da atividade de esfingomielinase da rLiD1.

O ponto em que apenas a rLiD1 5µg/mL foi adicionada ao reagente é o 100 % de atividade de esfingomielinase e aqueles pontos em que apenas os peptídeos foram acrescentados eram o 0%. A adição crescente de peptídeo nas concentrações de 5; 10 e 15 µg/mL, tem por objetivo verificar a redução da atividade enzimática.

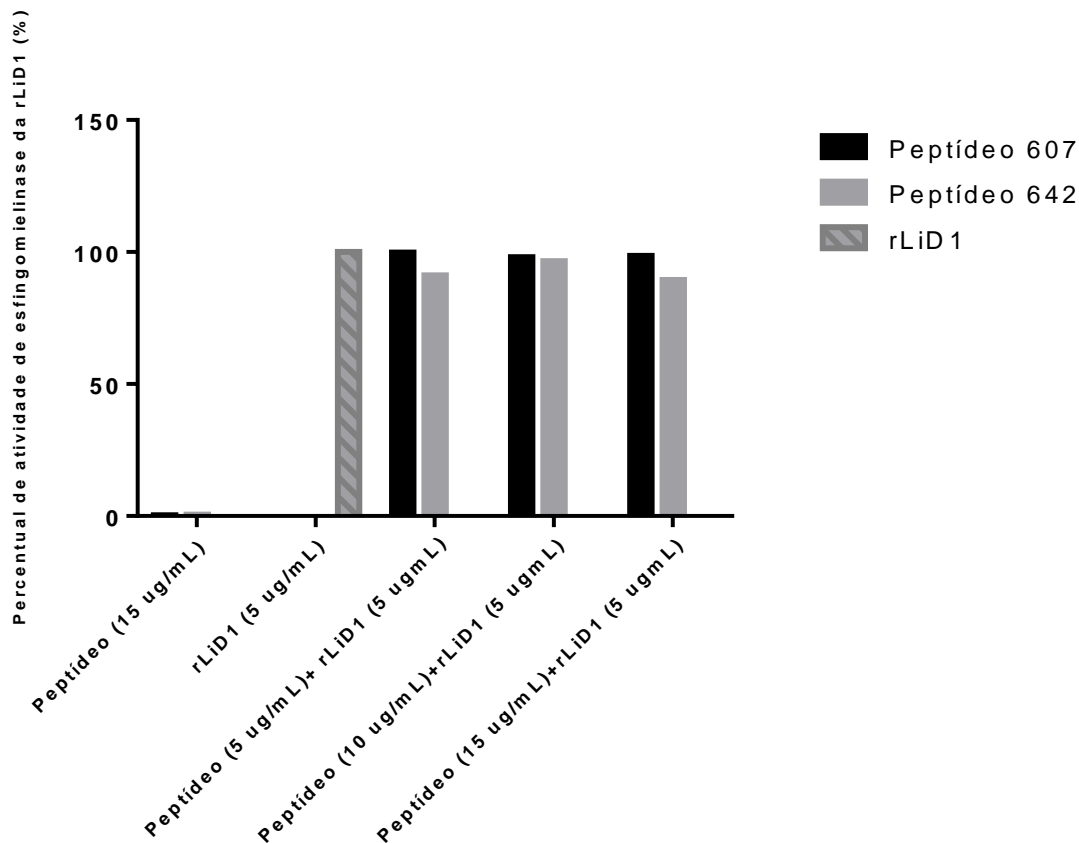


Figura 18 Avaliação da capacidade inibitória dos peptídeos 607 e 642 sobre atividade de esfingomielinase da rLiD1. A proteína rLiD1 na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ foi incubada ou não com peptídeo 607 ou 642 e sua atividade de esfingomielinase foi determinada. O ensaio foi normalizado e o resultado expresso em percentual de atividade enzimática. Cada coluna representa a média de duas replicatas.

Constatou-se que os peptídeos 607 e 642, por si só não possuem nenhuma atividade enzimática, 0,3 e 0,6%, respectivamente.

A atividade de esfingomielinase da rLiD1 (5 $\mu\text{g/mL}$) incubada com o peptídeo 607 ou 642 foi semelhante àquela obtida apenas com rLiD1 e portanto ambos não foram capazes de neutralizar sua atividade.

Caso a concentração de rLiD1 utilizada no ensaio esteja muito elevada esta condição não permite a identificação da redução da atividade enzimática causada pelos peptídeos, para tanto, é necessário titular a concentração do antígeno e verificar a partir de qual título a atividade de esfingomielinase reduz proporcionalmente com a diluição.

Conforme demonstrado em (Alvarenga et al. 2003) é necessário 50 µg de Li mAb(7) para neutralizar duas doses mínimas necrosantes (MND) de veneno *L. intermedia*, que corresponde à 10 µg. Assim, é necessário determinar também a concentração de Li mAb(7) neste ensaio de neutralização “*in vitro*” para embasar um intervalo de concentração de peptídeos para se obter alguma atividade neutralizante.

A elevada preferência da rLiD1 pelo substrato em detrimento dos peptídeos podem deslocar os peptídeos caso estes exibam uma ligação de baixa afinidade, além disso, o tamanho do peptídeo poderia também explicar a ausência de ação neutralizante, pois apesar de se ligar à proteína rLiD1 não impediria seu acoplamento ao substrato.

6. CONCLUSÃO

Desde a descoberta do papel dos anticorpos como parte do sistema imunológico por Behring e Kitasato (Behring and Kitasato 1890), a proposta para explicar a interação antígeno-anticorpo por Paul Ehrlich em 1900 (Ehrlich 1899) e a produção do primeiro anticorpo monoclonal de murino (Köhler and Milstein 1975) foram realizados vários avanços como a humanização de anticorpos resultando na fundação de muitas empresas biotecnológicas dedicadas a produção de anticorpos terapêuticos (Reichert et al. 2005).

Já os antivenenos não evoluíram como os anticorpos terapêuticos e em geral são preparados por hiperimunização de animais, principalmente cavalos e ovelhas (Espino-Solis et al. 2009).

Infelizmente os antivenenos disponíveis às vezes não protegem eficientemente o paciente. Uma das razões é o fato de que o antiveneno produzido não tem anticorpos que reconhecem especificamente um componente tóxico específico. Além disso, há outras dificuldades na produção de antivenenos como a obtenção do veneno, sofrimento dos animais imunizados que mimetizam quadro de envenenamento e a extensa variabilidade inter e intraespecífica na composição bioquímica dos venenos que pode afetar a eficácia neutralizante dos soros (Harrison et al. 2011).

Por estas razões é necessário dedicar estudos que explorem novas ferramentas e variações no modo clássico de produção de antivenenos contra animais peçonhentos. Uma iniciativa promissora em desenvolvimento para substituição de soroterapia é o uso de anticorpos monoclonais e suas preparações recombinantes (Espino-Solis et al. 2009).

Neste estudo buscamos a obtenção de peptídeos com elevado potencial neutralizante dos efeitos tóxicos da *L. intermedia*, proveniente do mapeamento do anticorpo monoclonal Li mAb(7).

A partir dos ensaios realizados foi possível identificar vários resíduos como GXXK e GDKR que compõem o paratopo do Li mAb(7) e a relevância do CDR-2H e sua localização. Peptídeos solúveis contendo estes aminoácidos foram sintetizados, e no teste de ELISA Sanduíche demonstraram que reconhecem especificamente a principal proteína dermonecrótica do veneno de *Loxosceles intermedia* (rLiD1) e a quimera rCpLi, que contém o epitopo conformacional reconhecido pelo anticorpo monoclonal.

O ensaio de ELISA por competição foi ineficaz em demonstrar que os peptídeos se ligam no mesmo epitopo reconhecido pelo Li mAb(7) e na verificação da atividade de esfingomielinase “*in vitro*” não foi caracterizado a capacidade neutralizante dos peptídeos sobre a atividade enzimática da rLiD1.

Doravante os resultados obtidos e possíveis hipóteses para explicar as dificuldades em demonstrar a competição entre peptídeos (607 e 642) e o Li mAb(7), e suas capacidades neutralizantes da atividade de esfingomielinase da rLiD1, várias perspectivas do projeto foram propostas a fim de atestar o potencial biotecnológico dos peptídeos.

7. PERSPECTIVAS

- Sintetizar, purificar e caracterizar bioquimicamente os peptídeos 607 e 642 com o objetivo de se obter um maior rendimento;
- Realizar o Ala-scanning nos peptídeos 607 e 642 para identificar quais resíduos são responsáveis pela ligação ao epitopo;
- Verificar se o aumento das concentrações de ambos os peptídeos no ensaio ELISA por competição são suficientes para deslocar o Li mAb(7) do epitopo;
- Titular a concentração de rLid1 e então verificar a capacidade de neutralização do Li mAb(7) no ensaio de atividade de esfingomielinase “*in vitro*”;
- Realizar ensaio de ELISA por competição substituindo a rLiD1 na fase sólida pela quimera rCpLi;
- Determinar as constantes de dissociação (Kd) dos peptídeos 607 e 642 por Ressonância Plasmônica de Superfície;
- Realizar a polimerização de ambos os peptídeos fim de se obter dímeros ou acoplá-los a grupos volumosos;
- Avaliar se os dipeptídeos ou peptídeos acoplados são capazes de impedir a interação entre Li mAb(7) e epitopo por ensaio de ELISA por competição;
- Avaliar a capacidade neutralizante de dipeptídeos e peptídeos acoplados em ensaio de esfingomielinase “*in vitro*”;

- Verificar “*in vivo*” se os dipeptídeos e os peptídeos acoplados possuem capacidade neutralizante da atividade dermonecrótica do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*;
- Sintetizar outros peptídeos que se mostraram reativos à rCpLi na membrana;
- Sintetizar um scFv composto exclusivamente por CDR-2H
- Caracterizar as estruturas secundárias dos peptídeos por dicroísmo circular

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Almagro, Juan C et al. 2011. “Antibody modeling assessment.” *Proteins* 79(11): 3050–66.

Alvarenga, Larissa M. et al. 2003. “Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay.” *Toxicon* 42(7): 725–31.

Appel, Mh, Rb Silveira, W Gremski, and Ss Veiga. 2005. “Insights into brown spider and loxoscelism.” *Invertebrate Survival J*: 152–58.

Behring, Emil von, and Baron Shibasaburō Kitasato. 1890. “Ueber Das Zustandekommen Der Diphtherie-Immunität Und Der Tetanus-Immunität Bei Thieren.” *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 49: 1–7.

Braz, A et al. 1999. “Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the brazilian spider *Loxosceles intermedia*.” *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 37(9): 1323–28.

Calderon-Aranda, E S, T Olamendi-Portugal, and L D Possani. 1995. “The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins.” *Vaccine* 13(13): 1198–1206.

De Castro, Cibele Soares et al. 2004. “Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*.” *Toxicon* 44(3): 273–80.

Chaim, Olga Meiri et al. 2011. “Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes.” *Toxins* 3(3): 309–44.

Chames, Patrick, Marc Van Regenmortel, Etienne Weiss, and Daniel Baty. 2009. “Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.” *British journal of pharmacology* 157(2): 220–33.

Chothia, C, and a M Lesk. 1987. “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins.” *Journal of molecular biology*

196(4): 901–17.

Crooks, Gavin E, Gary Hon, John-Marc Chandonia, and Steven E Brenner. 2004. “WebLogo: A sequence logo generator.” *Genome research* 14(6): 1188–90.

Duarte, Clara Guerra et al. 2010. “In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope.” *Vaccine* 28: 1168–76.

Ehrlich, Paul. 1899. “Croonian Lecture: On immunity with special reference to cell life.” *Proceedings of the Royal Society of London (1854-1905)* 66(-1): 424–48.

Espino-Solis, G. P., L. Riaño-Umbarila, B. Becerril, and L. D. Possani. 2009. “Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives.” *Journal of Proteomics* 72(2): 183–99.

Fang, Xiang et al. 2012. “Mapping paratope on antithrombotic antibody 6B4 to epitope on platelet glycoprotein Ibalph α via molecular dynamic simulations.” *PLoS ONE* 7(7): 1–12.

Felicori, L et al. 2006. “Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider.” *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 48(5): 509–19.

Felicori, Liza et al. 2009. “An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes.” *Vaccine* 27(31): 4201–8.

Figueiredo, Luís F M et al. 2014. “Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses.” *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 86: 59–67.

Floudas, C a. 2007. “Computational methods in protein structure prediction.” *Biotechnology and bioengineering* 97(2): 207–13.

Frank, Ronald. 1992. "Spot-Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support." *Tetrahedron* 48(42): 9217–32.

Futrell, J M. 1992. "Loxoscelism." *The American Journal of the Medical Sciences* 304(4): 261–67.

G M Edelman, B Benacerraf. 1962. "On structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma-system." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48(6): 1035.

Gangoiti, Patricia et al. 2008. "Implication of ceramide, ceramide 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate in tumorigenesis." *Translational Oncogenomics* 2008(3): 81–98.

Gonçalves de Andrade, Rute Maria, Wilson R Lourenço, and Denise Vilarinho Tambourgi. 2000. "Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, Sicariidae)." *Journal of Arachnology* 28(2): 245–47.

Gremski, Luiza Helena et al. 2010. "A Novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis." *Molecular bioSystems* 6(12): 2403–16.

Guruprasad, K, B V Reddy, and M W Pandit. 1990. "Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence." *Protein Engineering* 4(2): 155–61.

Harrison, Robert a. et al. 2011. "Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress." *Journal of Proteomics* 74(9): 1768–80.

Kabat, E.A. et al. 1984. "Sequences of proteins of immunological interest." *Analytical Biochemistry* 138(1): 265.

Kaiser, E, R L Colescott, C D Bossinger, and P I Cook. 1970. "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides." *Analytical Biochemistry* 34(2): 595–98.

Kalapothakis, Evanguedes et al. 2002. "Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom." *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 40(12): 1691–99.

Kandárová, Helena, and Silvia Letašiová. 2011. "Alternative methods in toxicology: Pre-validated and validated methods." *Interdisciplinary Toxicology* 4(3): 107–13.

Kaur, Harpreet, Aarti Garg, and GPS Raghava. 2007. "PEPstr: A de Novo method for tertiary structure prediction of small bioactive peptides." *protein and peptide letters* 14(7): 626–31.

Köhler, G, and C Milstein. 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975." *Nature* 256: 495–97.

Laune, Daniel et al. 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 Immunological Methods* 267: 53–70.

Lyskov, Sergey et al. 2013. "Serverification of molecular modeling applications: The Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE)." *PLoS ONE* 8(5): 5–7.

Ma, Buyong, Tal Elkayam, Haim Wolfson, and Ruth Nussinov. 2003. "Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(10): 5772–77.

MacCallum, R M, a C Martin, and J M Thornton. 1996. "Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography." *Journal of molecular biology* 262(5): 732–45.

Málaque, Ceila Maria Sant Ana et al. 2002. "Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 44(3): 139–43.

Marques-da-Silva, Emanuel, and Marta Luciane Fischer. 2005. "Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles heinecken & lowe*, 1835 (Araneae; Sicariidae) No estado do Paraná." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(4): 331–35.

Mendes, T. M. et al. 2013. "Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom." *Vaccine* 31(25): 2749–55.

Merrifield, RB. 1969. "Solid-Phase peptide synthesis." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32: 221.

Mian, I S, a R Bradwell, and a J Olson. 1991. "Structure, function and properties of antibody binding sites." *Journal of molecular biology* 217(1): 133–51.

Ministério da Saúde, and Ministério da Saúde. 2001. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*.

Mirick, GR, and BM Bradt. 2004. "A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. not four letter words." *The quarterly journal of ...* 48(4): 251–57.

de Moura, J. et al. 2011. "Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides." *Vaccine* 29(45): 7992–8001.

Nikoloudis, Dimitris, Jim E Pitts, and José W Saldanha. 2014. "Disjoint Combinations Profiling (DCP): A new method for the prediction of antibody CDR conformation from sequence." *PeerJ* 2(1970): e455.

Van Noorden, Richard, Brendan Maher, and Regina Nuzzo. 2014. "The Top 100 papers." *Nature* 514(7524): 550–53.

Pauli, Isolete, Juliana Puka, Ida Cristina Gubert, and João Carlos Minozzo. 2006. "The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment." *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 48(2): 123–37.

Putnam, F, Y Sheng, V Liu, and T Low. 1979. "Primary structure of a human IgA1 the Alpha 1 heavy chain . Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin." *J Biol Chem.* 254(8): 2865–74.

Ramos-Vara, J. a., and M. a. Miller. 2014. "When tissue antigens and antibodies get along: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique." *Veterinary pathology* 51(1): 42–87.

Reichert, Janice M, Clark J Rosensweig, Laura B Faden, and Matthew C Dewitz. 2005. "Monoclonal antibody successes in the clinic." *Nature biotechnology* 23(9): 1073–78.

Ribeiro, R. O S et al. 2007. "Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venom." *Toxicon* 50(8): 1162–74.

Ribeiro, V R D et al. 1993. "Epidemiologia do acidente por aranhas Do gênero *Loxosceles heinecken*; *lowe* no estado do Paraná (Brasil)." *Memórias do Instituto Butantan* 55(1): 19–26.

Rivera, Io-Guané et al. 2015. "Sphingomyelinase D/Ceramide 1-Phosphate in cell survival and inflammation." *Toxins* 7(5): 1457–66.

Schneider, T D, and R M Stephens. 1990. "Sequence Logos: A new way to display consensus sequences." *Nucleic acids research* 18(20): 6097–6100.

Schroeder, Frank C et al. 2008. "NMR-Spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38): 14283–87.

Sela-Culang, Inbal, Vered Kunik, and Yanay Ofra. 2013. "The structural basis of antibody-antigen recognition." *Frontiers in Immunology* 4(October): 1–13.

Sezerino, Ulisses Marion et al. 1998. "A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92(5): 546–48.

Silva, Ageane Mota da, Paulo Sérgio Bernarde, and Luiz Carlos de Abreu. 2015. "Accidentes with poisonous animals in Brazil by age and sex." *Journal of Human Growth and Development* 25(1): 54.

da Silva, Paulo Henrique et al. 2004. "Brown spiders and loxoscelism." *toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 44(7): 693–709.

Sivasubramanian, Arvind, Aroop Sircar, Sidhartha Chaudhury, and Jeffrey J. Gray. 2009. "Toward high-resolution homology modeling of antibody Fv regions and application to antibody-antigen docking." *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 74(2): 497–514.

Tambourgi, Denise V. et al. 2005. "*Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression." *Journal of Investigative Dermatology* 124(4): 725–31.

Wang, Wei et al. 2007. "Antibody structure, instability, and formulation." *Journal of pharmaceutical sciences* 96(1): 1–26.

Wu, T T, and E a Kabat. 1970. "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity." *The Journal of experimental medicine* 132(2): 211–50.

Young, Anna R., and Steven J. Pincus. 2000. "Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*." *Toxicon* 39(2-3): 391–400.