

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

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DA CROTOXINA, PRINCIPAL
NEUROTOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*
(CASCAVEL SUL AMERICANA)**

DENIS ALEXIS MOLINA MOLINA.

DENIS ALEXIS MOLINA MOLINA.

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DA CROTOXINA, PRINCIPAL
NEUROTOXINA DO VENENO *Crotalus durissus terrificus*
(CASCAVEL SUL AMERICANA)**

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

ORIENTADOR: DR. CARLOS DELFIN CHÁVEZ OLÓRTEGUI.

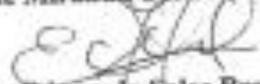
BELO HORIZONTE.

FEVEREIRO 2017.



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DENIS ALEXIS MOLINA MOLINA. Aos nove dias do mês de fevereiro de 2017 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Mapeamento de epítomos da Crotoxina, principal Neurotoxina do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavél sulamericana)", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ieso de Miranda Castro (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovado; Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2017.


Dr. Ieso de Miranda Castro (Universidade Federal de Ouro Preto)


Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo (UFMG)


Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG)


Prof. Leda Quercia Vieira
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Agradecimentos.

Ao professor Dr. Carlos Chavez Olortégui, pela orientação e ensinamentos, que tornaram possíveis a realização deste trabalho e pela oportunidade e confiança de receber-me em seu laboratório.

Aos membros da banca Dr. Ieso De Miranda Castro e ao Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo pela disponibilidade e presença, enriquecendo ao meu desenvolvimento científico.

A Dra Clara Guerra Duarte, pela paciência, ensinamentos, disponibilidade para sempre dar ajuda a todos do laboratório, pelo seu bom humor e companherismo.

Ao Dr Ricardo Avila por toda sua ajuda, sempre dando excelentes dicas e assessoramento no trabalho com os peptídeos.

A Dra Stephanie Stransky por sua colaboração na correção deste trabalho, paciência e por ser uma excelente companheira de laboratório.

Ao Dr Edgar Gonzalez, por todas as ensinamentos em bioinformática e pela acolhimento quando cheguei ao laboratório.

Ao Dr Frey Romero, por toda suas dicas no trabalho com proteínas e companherismo.

A todos os colegas de laboratório, Letícia, Camila, Luísa, Luís, Patricia, Andresa, Sabrina, Carolina, Elizângela, Fernanda, Pricila Cunha, Priscila Araujo pela amizade, companheirismo, por dividirem seus conhecimentos e sempre ajudar nos momentos necessários

A Giovana por ser uma boa amiga ajudando-me na adapta ao laboratório em meus primeiros dias no Brasil, suas grande paciência e ajuda.

Ao grande amigo Rodrigo, sempre animando-me e compartilhando ideas de trabalho, mostrando-me que todos os latino-americanos somos muito legais.

A minha família, que sempre me apoia e respeita minhas decisões, mesmo sendo difícil estar longe de todos eles. Obrigado por tudo e por me ensinarem a ser um homem de bem.

A todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram tanto dentro e fora da facultade, principalmente e minha adaptação nesta nova etapa de minha vida no Brasil, Sr Fuad, Sra Gloria, Danya, Fatima Castro.

Ao meus bons amigos Daniela e Hector, sem sua grande ajuda eu não estaria aqui no Brasil e concretizando essa etapa de minha vida. Sou sempre agradecido a vocês, são minha familia aqui no Brasil, por sempre estar nos momentos mais difíceis.

Resumo:

Crotoxina (CTx) é uma proteína dimerica responsável pela atividade neurotóxica do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Neste trabalho nós utilizamos três técnicas diferentes para o mapeamento de epítomos lineares para células B na crotoxina. Os três métodos foram: Predição por bioinformática, método de Spot-Síntese e mapeamento por implantes subcutâneos de peptídeos em camundongos. Soros de cavalos imunizados com veneno total de *C. d. terrificus* foram utilizados no método de Spot-Synthesis. Imunoensaios no método de Spot-Synthesis revelam que a região C-terminal de cada uma das subunidades que conformam a CTx é uma região imunogenicamente dominante. Estes resultados foram coincidentes com os resultados obtidos pelo método bioinformático. O mapeamento por implantes subcutâneos identificaram outras regiões imunodominantes da crotoxina. Os peptídeos correspondentes as regiões imunogênicas previamente identificadas foram sintetizadas quimicamente e a pureza desses peptídeos foram avaliados por espectrometria de massas. Os peptídeos sintéticos foram antigenicamente caracterizados por imunoblot utilizando soro de cavalo anticrotálico e para a caracterização imunogênica dos peptídeos, eles foram polimerizados com glutaraldeído e usados como imunógenos na imunização de camundongos. Anticorpos de camundongos anti-peptídeos reconheceram a CTx o veneno total de *C. d. terrificus* e os peptídeos sintéticos. Todos os epítomos foram localizados na estrutura 3D da CTx e eles se encontram localizados na superfície da proteína.

Palavras-chaves: *Crotalus durissus terrificus*, crotoxina, fosfolipasa A₂ (PLA₂), epítomos, peptídeos sintéticos.

Abstract:

Crotoxin (CTx) is a dimeric protein that is responsible for the neurotoxic activity of *Crotalus durissus terrificus* venom. In this work we have used 3 different techniques for mapping of linear epitopes of the Crotoxin B cells. The three methods were: Prediction by bioinformatics, Spot-Synthesis method and mapping by subcutaneous implants of peptides in mice. Sera of horses immunized with the total venom of *C. d. terrificus* were used in the Spot-Synthesis method. Immunoassays in the Spot-Synthesis method have shown that the C-terminal region of each of the CTx subunits is a dominant immunogenic region. These results were similar to the ones obtained by the bioinformatic method. Mapping by subcutaneous implants has identified other immunodominant regions of the crotoxin. The previously identified amino acid sequences corresponding to the immunogenic regions were chemically synthesized and the purity of these peptides were evaluated by mass spectrometry. The synthetic peptides were antigenically characterized by immunoblot using anticrotalic horse serum, for the immunogenic characterization of peptides, they were polymerized with glutaraldehyde and used as immunogens in the immunization of mice. Anti-peptide anti-mouse antibodies recognized CTx, the total venom of *C. d. Terrificus* and the synthetic peptides. All epitopes were found in the CTx 3D structure and they are located on the surface of the protein.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*, crotoxin, phospholipase A₂ (PLA₂), epitopes, synthetic peptides.

Lista de abreviaturas.

Ag-Ac antígeno anticorpo

Asp ácido aspártico

BCIP 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BSA Do inglês Bovine Serum Albumin

Cdt *Crotalus durissus terrificus*

CTx crotoxina

DMF dimetilformamida

Elisa Do inglês Enzyme linked immunosorbent assay

F(ab')₂ Do inglês Fragment of antigen binding (bivalente)

Fmoc Grupo Fluorenilmetoxicarbonil

Funed Fundação Ezequiel Dias, de Belo Horizonte MG.

His Histidina

IB Instituto Butantan, São Paulo SP.

ICV intra cérebro ventriculas

MTT metil thiazolyldiphenil tetrazolium

PBS Tampão fosfato salino

PBS-TWEEN Tampão fosfato salino acrescido de Tween

PDB Do inglês Protein Data Bank

PI Ponto isoelétrico

PLA₂ Fosfolipase A₂

SC subcutaneo

SDS dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato sódio

TFA Ácido trifluoroacético

Índice:

Agradecimentos.....	iii
Resumo:	vi
Abstract:	vii
Lista Figuras:	xii
Lista de tabela:.....	xiv
1. Introdução	1
1.1 Ofidismo	1
1.2 Família Viperidae	3
1.2.1 Gênero: <i>Crotalus</i>	3
1.3 Composição do veneno das serpentes do gênero <i>Crotalus</i> da América do Sul	4
1.4 Componentes bioquímicos do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	5
1.5 Aspectos Gerais da Crotoxina	7
1.6 Atividade neurotoxica da crotoxina	10
1.7 Antivenenos.	14
1.8 Predição de epítomos	16
1.9 Epítomos de proteínas para linfócitos B	17
1.10 Mapeamento de epítomos	18
1.11 Implantes subcutâneos	19
2. Justificativa	21
3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22

4. Materiais e Métodos	23
4.1 Venenos	23
4.2 Produções de anticorpos anti crotoxinas	23
4.3 ELISA.....	23
4.4 Predição de epítomos	24
4.4.1 Epítomos para Linfócitos B.....	24
4.4.2 Seleção dos epítomos através do Método Spot	24
4.5 Síntese em membrana de celulose.....	24
4.6 Imunoensaio de SPOT	25
4.6.1 Reação com o soro	25
4.6.2 Revelação fosfatase alcalina	26
4.6.3 Regeneração da membrana	26
4.6.4 Imunização com implantes subcutaneos	26
4.7 Modelagem de peptídeos.....	28
4.8 Síntese Química de Peptídeos	29
4.9 Espectrometria de massa.....	30
4.10 Polimerização dos peptídeos com glutaraldeído.....	30
4.11 Imunocaracterização com Dot blot	31
4.12 Imunização com peptídeos sintéticos.....	31
5. Resultados	32
5.1 Predição de epítomos lineares na crotoxina para linfócitos B	32
5.2 Localização das regiões imunodominantes da crotoxina em membrana de celulose.....	34
5.3 Imunização com disco de membrana de celulosa	38
5.4 Modelagem por homologia da Ctx, (subunidade ácida).....	43

5.5 Síntese química dos epítopos selecionados pelos diferentes métodos de imunização aplicados	46
5.6 Caracterização antigênica dos peptídeos sintetizados.....	51
5.7 Caracterização imunogênica dos anticorpos	51
6. Discussão	53
7. Conclusão.....	59
8. Trabalhos futuros.....	60
9. Referências Bibliográficas.....	61

Lista Figuras:

Figura 1. Número de casos de acidentes ofídicos vs taxa de mortalidade.	2
Figura 2. Composição proteica global dos venenos das subespécies <i>C. simus</i> e <i>C. durissus</i> . Presença relativa de proteínas de diferentes famílias de toxinas nos venenos da serpente	5
Figura 3. Modelo estrutural do arranjo quaternário da crotoxina B (CB)	9
Figura 4. Modelos estrutural do complexo heterodimérico não covalente da crotoxina (isoforma CA ₂ CBb)	10
Figura 5. Esquema resumindo das principais ações intracelulares da crotoxina em nervos e músculos	13
Figura 6. Representação das regiões de CA.	33
Figura 7. Representação das regiões da CB.....	34
Figura 8. Membranas de spot contendo as sequências de proteínas do veneno <i>Crotalus durissus terrificus</i>	36
Figura 9. Membrana de spot contendo os peptídeos relativos à crotoxina	37
Figura 10. Membrana de spot contendo os peptídeos relativos à crotoxina..	37
Figura 11. Estrutura 3D da região C-terminal da subunidade básica da crotoxina.....	38
Figura 12. Reatividade dos soros dos camundongos imunizados. com spots correspondentes à subunidade ácida da crotoxina.	39
Figura 13. Reatividade dos soros dos camundongos imunizados. Com spots correspondentes à subunidade básica da crotoxina.....	39
Figura 14. Visualização da estrutura 3D do complexo crotoxina em duas configurações diferentes.....	41
Figura 15. Visualização da estrutura 3D da crotoxina, em duas configurações diferentes.	42
Figura 16. Representação estrutural no modelo 3D do sequência de aminoácidos do peptídeo 13 da subunidade ácida da crotoxina.	43
Figura 17. Sobreposição da subunidade básica da crotoxina de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e subunidade ácida da Fosfolipase A ₂ ácida do veneno de <i>Agkistrodon halys pallas</i> , (A), em azul região que corresponde ao spot 13 da (CA).	44

Figura 18. Análise da qualidade e confiabilidade do modelo da estrutura da proteína modelada. Vital na predição de estrutura de proteínas. Analizada com Qmean serve.....	45
Figura 19. Perfil de análise por espectrometria de massas do peptídeo 1	48
Figura 20. Perfil de análise por espectrometria de massas do peptídeo 2	48
Figura 21. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 3.	49
Figura 22. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 4	49
Figura 23. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 5.	50
Figura 24. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 6.	50
Figura 25. Dot Blot dos peptídeos da crotixina	51
Figura 26. Dot Blot da avaliação dos soros produzidos.....	52

Lista de tabela:

Tabela 1. Visão geral da ocorrência relativa de proteínas no veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	6
Tabela 2. Grupos experimentais da Crotoxina, subunidade ácida (UniProt P08878).....	27
Tabela 3. Grupos experimentais da Crotoxina, subunidade básica (UniProt POCAS6)	28
Tabela 4. Epítomos preditos para Linfócitos B da subunidade ácida (CA) pelo programa ABCpred.....	32
Tabela 5. Epítomos preditos para Linfócitos B da subunidade básica (CB) pelo programa ABCpred.....	33
Tabela 6. Spot reativos da subunidade ácida.....	40
Tabela 7. Spots reativos da subunidade básica.....	40
Tabela 8. Desafio em camundongos imunizados com implantes de discos cortados da membrana de spot..	45
Tabela 9. Sequência de aminoácidos dos peptídeos seleccionados por diferentes métodos e sintetizados quimicamente	46

1. Introdução

1.1 Ofidismo

Serpentes constituem um grupo de répteis caracterizado principalmente pelo corpo longo e cilíndrico, essencialmente sem membros. Seu corpo é recoberto por escamas, conferindo-lhes um aspecto ora brilhante ora opaco, apresentando uma certa aspereza quando são tocadas. As serpentes são animais ectotérmicos que não conseguem controlar a temperatura de seu corpo (Ferreira 2005).

As serpentes podem ser classificadas em dois grupos básicos: as peçonhentas, que são aquelas que possuem glândulas produtoras de veneno, e as não peçonhentas que não possuem glândulas produtoras de veneno. É de grande importância, tanto médica quanto ecológica, que as serpentes de uma região, peçonhentas ou não, sejam reconhecidas e identificadas de forma a auxiliar no rápido e preciso tratamento soroterápico das vítimas desse tipo de acidente e para conhecimento da fauna ofídica local. (BUTANTAN, 2006)

Segundo a Organização Mundial de Saúde existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, sendo que 10 a 14% são consideradas peçonhentas (Pinho, F. e Pereira, D., 2001). Estes animais apresentam-se em tamanhos variados que vão desde espécies escavadoras, que se alimentam de cupins e crescem até 10 centímetros, a grandes constritoras, com quase 10 metros de comprimento (Lillywhite, H. 2014).

Atualmente as serpentes conhecidas estão espalhadas pelos cinco continentes, ilhas e mares, desde a linha do equador até próximo dos círculos polares, aumentando gradativamente o número de espécies nas regiões tropicais. No Brasil existem aproximadamente 250 espécies de serpentes distribuídas em todo território nacional, sendo que destas, 70 são peçonhentas. A maioria dos acidentes humanos que levam a quadros de envenenamento que merecem atenção médica deve-se a serpentes pertencentes a quatro famílias, que englobam os gêneros: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu e outros), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu, surucutinga) e *Micrurus* (coral). (Ferreira 2005).

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

Nos últimos dados publicados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), no ano 2015 se notificaram 16375 acidentes com serpentes, dos quais 13373 correspondem ao gênero *Bothrops* seguido do gênero *Crotalus* com 1442, as quais são as principais serpentes causantes de acidentes ofídicos, mostrado na Figura 1, onde as serpentes do gênero *Crotalus* tem a maior taxa de mortalidade.

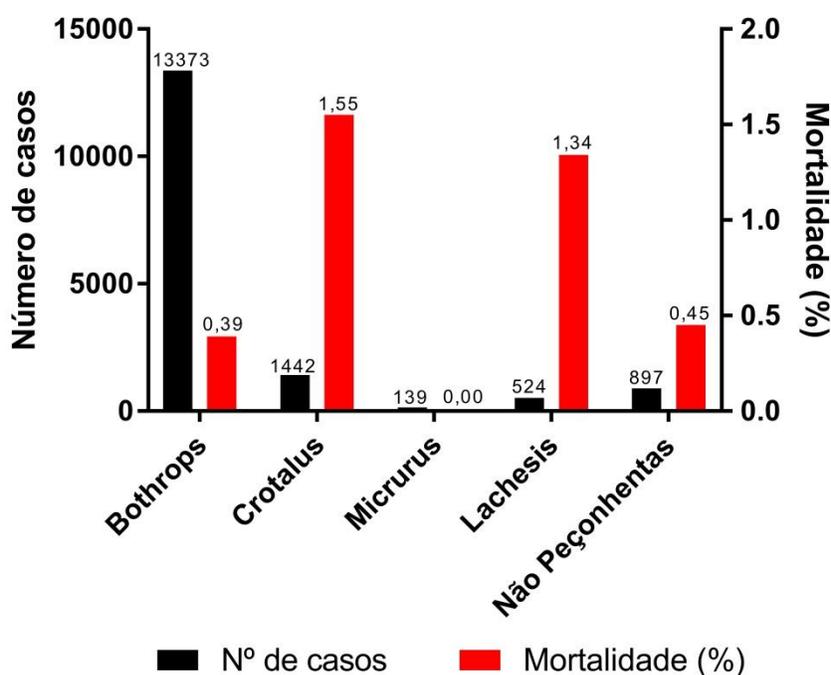


Figura 1. Número de casos de acidentes ofídicos vs taxa de mortalidade. Serpentes do generos *Bothrops* tem maior incidencia de casos, seguida das serpentes do genero *Crotalus*, que por sua vez estas ultimas apresentam um maior porcentagem de letalidade.

1.2 Família Viperidae

1.2.1 Gênero: *Crotalus*

Serpentes do gênero *Crotalus* (também conhecidas como cascavéis) são responsáveis por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões. Apresenta o maior coeficiente de letalidade devido à frequência com que os casos de envenenamento envolvendo essas serpentes evolui para insuficiência renal aguda. São encontradas desde o Paraná até o Piauí em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e raramente na faixa litorânea. Não ocorrem na Floresta Amazônica e no Pantanal. O gênero agrupa várias subespécies, pertencentes à espécie *Crotalus durissus*. (Calvete et al., 2010 e FUNASA, 2001).

Em geral não são agressivas e, quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho. As principais ações do veneno de cascavel são: neurotóxica, miotóxica e coagulante. As manifestações clínicas são importantes no acidente crotálico apresentando um quadro local pouco expressivo sem dor. Há parestesia local ou regional que pode persistir por tempo variável, podendo ser acompanhada de edema discreto ou eritema no ponto da picada. Pode ocorrer também mialgia generalizada, podendo haver evolução para insuficiência renal aguda, causa maior de óbito neste grupo (Pinho, F. e Pereira, D., 2001).

Os venenos das cascavéis da Sul América, são notórios por sua capacidade de causar miotoxicidade sistêmica e desabilitar a transmissão neuromuscular, causando paralisia progressiva. A neurotoxicidade nas picadas de *Crotalus* é atribuída principalmente à presença de altas concentrações de crotoxina. Hemorragia pode estar presente, mas quaisquer efeitos correspondentes são completamente ofuscados pelos sintomas neurotóxicos surpreendentes e graves. (Calvete et al 2010).

Em contraste, as cascavéis neotropicais da América do Sul geralmente carecem de atividades proteolíticas, hemorrágicas e edematogênicas, e os envenenamentos por estas espécies são muito diferentes das de espécies neárticas. Só a *C.d.cumanensis* (Venezuela) é uma exceção, e que as mordidas por esta serpente são caracterizadas por manifestações

locais, ou seja, edema, sangramento e necrose, além de neurotoxicidade sistêmica, miotoxicidade e coagulopatia. (Calvete et al 2010).

1.3 Composição do veneno das serpentes do gênero *Crotalus* da América do Sul

O veneno das serpentes é uma poderosa mistura de proteínas e peptídeos que estão envolvidos na ligação com receptores, canais iônicos ou que possuem atividade enzimática, além de carboidratos, nucleotídeos, lipídios, e metais iônicos, cujas funções não são totalmente conhecidas. Os venenos interagem com uma variedade de proteínas de mamíferos e podem desregular o sistema nervoso, cardiovascular, a cascata de coagulação e a homeostase em geral. As toxinas possuem grande especificidade e atividades biológicas, como por exemplo neurotóxica, miotóxica e coagulante (Vonk et al., 2011).

Os mecanismos que controlam as variações e produção dos venenos não são completamente entendidos. Essas variações são adaptações para facilitar a captura da presa, seus efeitos variam de organismo para organismo, e dependem da quantidade a ser inoculada em cada caso de envenenamento. Apesar disso, a composição do veneno em animais da mesma espécie é muito semelhante, bem como as famílias de proteínas encontradas em venenos de serpentes que possuem relações filogenéticas (Mackessy, 2010).

Os venenos de cascavel da América do Sul são notórios por sua capacidade de causar miotoxicidade sistêmica e desabilitar a transmissão neuromuscular, causada pela crotamina e crotoxina (fosfolipase A₂) que são as principais proteínas das serpentes do gênero *Crotalus* de América do Sul, como se pode observar na figura 2, onde se mostra a composição dos venenos do gênero *crotalus*. (Calvete et al 2010).

As serpentes cascavel neotropicais da América do Sul geralmente carecem de atividades proteolíticas, hemorrágicas e edematogênicas, e os envenenamentos por estas espécies são muito diferentes das de espécies neárticas., *C.d.cumanensis* (Venezuela) é uma exceção, e as mordidas por esta cobra são caracterizadas por manifestações locais, ou seja, edema, sangramento e necrose, além de neurotoxicidade sistêmica, miotoxicidade e

coagulopatia, na Figura 2, mostrando uma comparativa entre esta serpente e as outras crotalus de América do Sul (Calvete et al 2010).

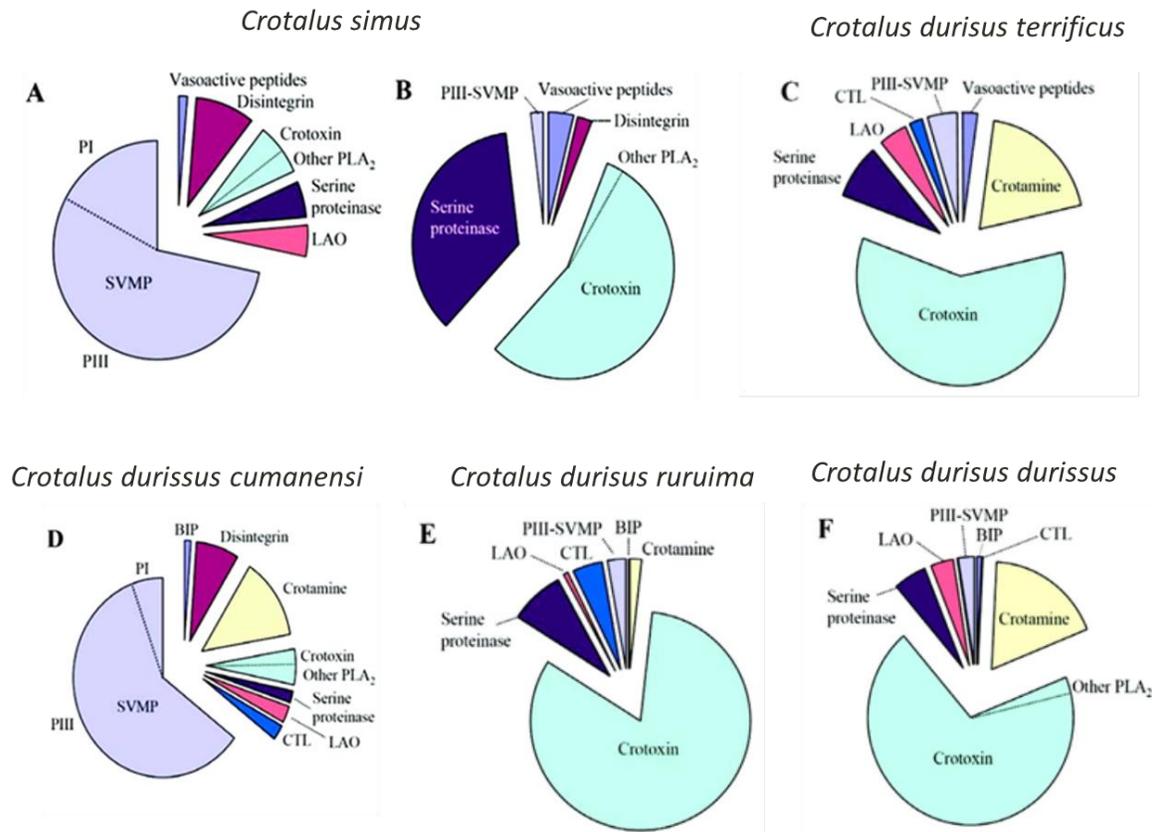


Figura 2. Composição proteica global dos venenos das subespécies *C. simus* e *C. durissus*. Presença relativa de proteínas de diferentes famílias de toxinas nos venenos da serpente (A) adulta e (B) neonato de *C. simus*. (C) *C. d. terrificus*, (D) *C. d. cumanensis*, (E) *C. d. ruruima*, e (F) *C. d. durissus*. BPP, peptídeo potenciador da bradicinina; Fragmentos DC, fragmento rico em desintegrina/cisteína do veneno de cobra PIII Zn²⁺ metaloproteínase (SVMPs); LAO, L-aminoácido oxidase; PLA₂, fosfolipase A₂; CRISP, proteína secretora rica em cisteína; CTL, Galectina, lectina específica de galactose; C-lectina, molécula do tipo lectina do tipo C. (Calvete et al, 2010).

1.4 Componentes bioquímicos do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*

Entre as cinco subespécies de *Crotalus durissus* encontradas no Brasil, *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) é a mais abundante. O fracionamento do seu veneno por cromatografia de exclusão molecular evidencia quatro principais toxinas: convulsina, giroxina, crotoxina e crodamina. No entanto, o veneno de *C. d. terrificus* possui composição altamente variável,

uma vez que a crotamina pode estar presente (positivo) ou ausente (negativo). Além da variação da crotamina, o veneno também pode apresentar uma diferença de cor que varia entre amarelo ou branco (Lourenço et al., 2013).

A tabela 1 mostra a composição porcentual das proteínas do veneno de *C. d. terrificus* demonstrando o alta porcentagem de crotoxina, fofolipase A₂ e crotamina (18-19%) (Calvete et al., 2010).

Tabela 1. Visão geral da ocorrência relativa de proteínas no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. (Porcentagem de proteínas totais separadas por HPLC).

Família de proteína	% de toxina no veneno total
Péptidos vasoativos	2,3
Bradicinina péptido inibitório	1,8
Peptídeos potenciadores de Bradicinina	0,5
Desintegrina	n.f.
Crotamina	19,0
PLA ₂	59,5
Crotoxina	59,5
Outras PLA _{2s}	n.f.
Serino proteínas	8,2
L-amino ácido oxidase	4,5
Lectinas do tipo C	1,7
Metaloproteases	4,8
PI-SVMPs	n.f.
PIII-SVMPs	4,8

n.f., não foi encontrado. (Calvete et al., 2010).

As proteínas com maior importância no veneno da Cdt são a crotoxina e crotamina que juntas representam aproximadamente 80% da proteína total do veneno, além da giroxina (serino preteasa) que representa 8%.

- A giroxina (serinoprotease) foi isolada pela primeira vez por Barrabi et al., 1978. Descrita como uma neurotoxina não letal, é responsável por induzir uma síndrome

neurológica que se inicia com um quadro cataléptico seguido de movimentos giratórios. Estes movimentos tem sido descritos como um aumento repentino e assimétrico no tônus do músculo esquelético, acompanhado por opistotônus, distorções espasmódicas e rotação ao longo do eixo do corpo (kruse et al., 1977).

- A crotamina foi isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus argentina*, pela primeira vez, por Gonçalves & Polson (1947). Foi, posteriormente, designada crotamina quando Gonçalves & Vieira (1950) a isolaram do veneno da cascavél brasileira da região central e sul. Estes autores mostraram que esta toxina induz espasmos musculares em camundongos e estes dados foram posteriormente convalidados (Barrio & Vital Brazil, 1951; Cheymol et ai., 1969; Cheymol et aí., 1971a; Cheymol et ai., 1971b). Esta proteína tem importância na imobilização da presa a ser ingerida pela serpente, causando contratura muscular e levando à paralisia dos membros posteriores de camundongos. Também induz necrose de células musculares esqueléticas. Após 72 horas da injeção da toxina a maioria das células afetadas apresenta-se completamente desorganizadas. No entanto, o sarcolema e a lâmina basal permanecem morfológicamente intactos (Ownby et al., 1988).
- A crotoxina é a principal toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e é descrita a seguir.

1.5 Aspectos Gerais da Crotoxina

A crotoxina é uma proteína heterodimérica formada por uma subunidade ácida (CA) chamada crotapotina carente de atividade enzimática e a subunidade básica (CB), tóxica com atividade de fosfolipase A₂ (Fusco et al., 2015). A crotoxina afeta principalmente a transmissão periféricas das junções neuromusculares, levando a paralisia respiratória e a subsequente morte do indivíduo acidentado (Sampaio et al., 2010).

Quando o complexo crotoxina é dissociado em seus componentes, as atividades miotóxica e neurotóxica são observadas apenas na fração básica PLA₂. Entretanto, a enzima

dissociada se mostra muito menos tóxica que no dímero (Sampaio et al., 2010; Rodríguez et al., 2006).

Numerosos estudos têm mostrado que a crotoxina também apresenta ação imunomodulatória, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-microbiana e analgésica (Sampaio et al., 2010). Estudos subsequentes mostraram que a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* tem diferentes isoformas, sendo que 16 diferentes isoformas foram identificadas, resultantes da associação aleatória de 4 isoformas da subunidade CA (CA₁, CA₂, CA₃ e CA₄) e 4 isoformas de CB (CBa₂, CBb, CBc e CBd) (Faurel et al., 2011).

Outros estudos mostraram que não é possível alquilar a His48 do resíduo catalítico da subunidade básica com *p*-BPB (Brometo de *P*-Bromofenacilo), quando a subunidade básica está sobre a forma da crotoxina. Entretanto, pode haver alquilação quando o complexo crotoxina está dissociado resultando, na inativação catalítica da subunidade CB, o que sugere que o sítio catalítico da subunidade básica é blindado pela subunidade ácida. O arranjo estrutural do complexo crotoxina é essencial para prevenir a absorção não específica da subunidade básica a membranas fosfolipídicas. Estudos cinéticos usando o complexo crotoxina e as subunidades básicas, mostraram que a subunidade básica é somente tóxica quando está no arranjo tetramérico com outra subunidade básica e duas subunidades ácidas (Sampaio et al., 2010).

Análise de difração de raios X, revelam a configuração da crotoxina. Essa toxina consiste em um arranjo tetramérico de dois heterodímeros que contem as isoformas básicas CB1 e CB2 mostrada na Figura 3. (Marchi-Salvador et al., 2008).

A subunidade básica (CB) que conformam a estrutura cristalográfica figura 4B possuem 7 pontes dissulfeto e outro grupo IIA PLA₂s, um N-terminal na α -hélice (h1), um loop de ligação ao Ca²⁺ em CB1, duas hélices antiparalelas (h2 e h3), duas cadeias antiparalelas curtas formadas por folhas β e um loop de C-terminal. A ausência dos ions Ca²⁺ em CB2 é provavelmente o resultado dos contatos interfaciais CB1/CB2 no heterodímero que causam uma modificação estrutural do loop de ligação Ca²⁺, sendo umas das diferenças estruturais mais importantes entre CB1 e CB2 (Marchi-Salvador et al., 2008).

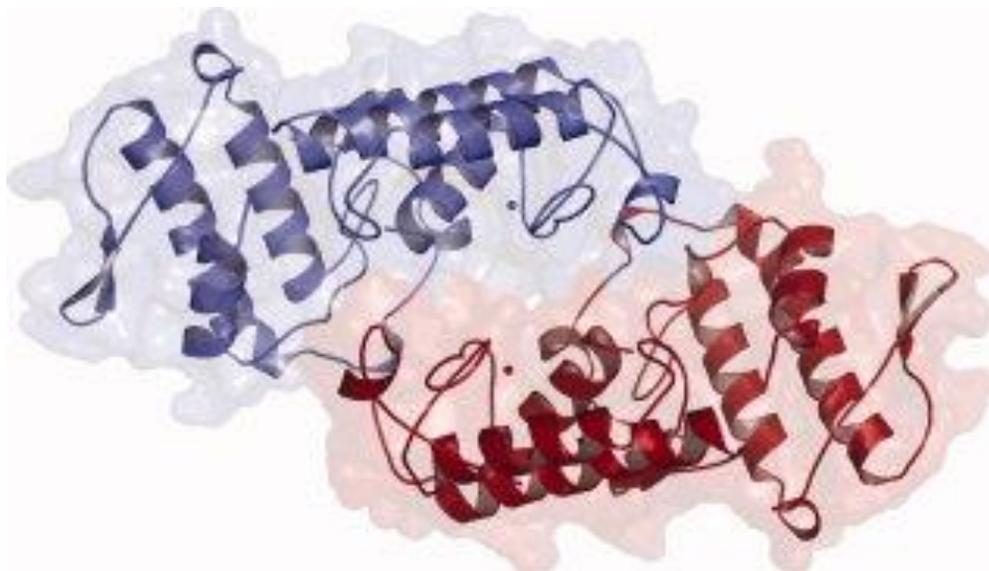


Figura 3. Modelo estrutural do arranjo quaternário da crotoxina B (CB). A estrutura completa é composta de dois heterodímeros compostos por um par de isoformas (CB1 azul e CB2 vermelho). As sequências de aminoácidos das isoformas diferem em apenas oito resíduos. (Marchi-Salvador et al. 2008).

Uma característica única do complexo crotoxina é a maneira em que as três cadeias ácida da subunidade CA₂ são complexadas com as cadeias simples da subunidade básica CBb dada pela semelhança estrutural entre elas (Figura 4). A crotoxina e um complexo não covalente é estabilizado por numerosos contatos hidrofóbicos, sete contatos intermoleculares, e um local de ligação de cloreto. Tanto a cadeia α quanto a cadeia β de CA₂ contribuem para a interface de superfície oculta com a subunidade CB. Oito resíduos da cadeia α e 17 resíduos da cadeia β fazem contatos directos com 22 resíduos de CBb e a distância é de menos de 4,5 Å. (Faure et al., 2011).

A crotoxina é uma fosfolipase A₂ E.C 3.1.1.4 que hidrolisa a ligação ester entre o segundo acil e o glicerol. O mecanismo de ação é iniciado pelo complexo His48 / Asp99 e o íon cálcio dentro do sítio ativo da enzima, que despolariza o oxigênio do carbonilo Sn-2 enquanto se coordena com uma molécula de água catalítica, His48 melhora a nucleofilicidade da água catalítica através de uma ponte com uma segunda molécula de água. Duas moléculas de água são necessárias para percorrer a distância entre a His48 e o ester (Faure et al 2011; Berg et al 2001).

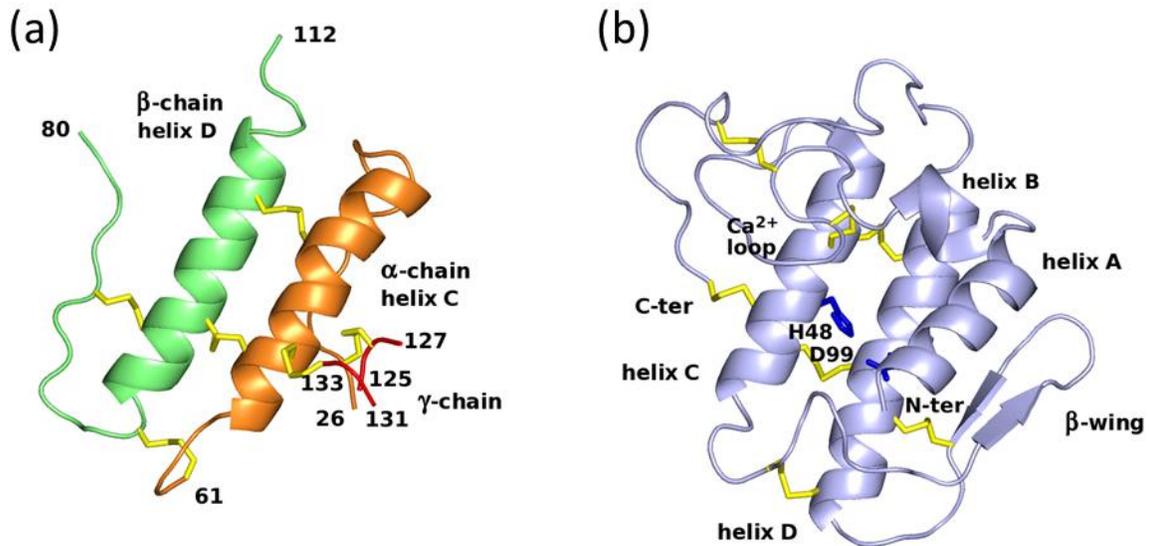


Figura 4. Modelos estrutural do complexo heterodimérico não covalente da crotoxina (isoforma CA₂CBB). (a) estrutura das três cadeias ácidas da subunidade CA₂, a cadeia alfa da CA₂ possui uma α -hélice (laranja), homóloga a hélice C do grupo básico da PLA₂. A cadeia beta possui uma α -hélice (verde) homóloga para a hélice D. (b) Vista da subunidade básica CBB da crotoxina na mesma orientação como em (a). As α -hélices A, B, C, e D; a folha β ; o laço de ligação de Ca²⁺; a díade catalítica (His48 / Asp99); e a região N-terminais e C-terminais é rotulada. As sete ligações dissulfeto conservadas estão apresentadas em amarelo (Faure, G et al 2011).

1.6 Atividade neurotóxica da crotoxina

Em vários animais como: ratos, cobaias, coelhos, gatos, cães e macacos, a crotoxina produz paralisia flácida. Em pombos e camundongos a paralisia é do tipo ascendente. O início da paralisia geralmente ocorre após um longo atraso, dura várias horas e é reversível em todas as espécies, exceto em coelhos. Em gatos e cães não anestesiados, o envenenamento causa defecação, salivação, vômitos e dano renal, mas a consciência não é afetada. Estes resultados contrastam com convulsões crônicas, sem paralisia, observadas após a administração intracerebroventricular (icv) de crotoxina em gatos. Essa administração acarreta (taquipnéia, salivação, vômitos e óbitos). (Sampaio et al., 2010)

Em cães anestesiados a, crotoxina (250 μ g/kg, iv) causou hipotensão transitória (redução de 25-33% na pressão sanguínea) que desenvolveu-se lentamente (2-3 minutos após a injeção), em contraste com o veneno total de Cdt. (250 μ g/kg, iv) que produziu mudanças

trifásicas na pressão arterial (hipotensão imediata, dentro de 0,5 min, seguidas de hipertensão e, em seguida, uma diminuição progressiva e sustentada da pressão arterial; 58% de redução)., Além disso, a crotoxina não teve nenhum efeito sobre a respiração em comparação ao veneno que inicialmente aumentou a frequência e amplitude dos movimentos respiratórios e em seguida causou apnéia e taquipnéia (Vital Brazil et al, 1966).

Juntos, esses estudos lançaram as bases para posteriores investigações sobre a farmacologia e o mecanismo de ação da crotoxina., As principais conclusões a respeito do mecanismo de ação são descritas a seguir ver também Figura 5:

1. Identificação do principal mecanismo envolvido em bloqueio neuromuscular. Vital Brazil (1966) concluiu que inicialmente a crotoxina causou bloqueio principalmente através de uma ação pós-sináptica. No entanto, embora as investigações subsequentes confirmaram esta atividade pós-sináptica e mostraram que ela envolve a estabilização da forma insensível do receptor nicotínico de acetilcolina (Vital Brazil et al., 2000), vários estudos nos anos 1970 demonstraram que o principal local de ação da crotoxina nas junções neuromusculares era pré-sináptica. (Vital Brazil e Excell, 1971; Hawgood e Smith, 1977; Chang e Lee, 1977). Por imunohistoquímica confirmou-se a localização da crotoxina nas junções neuromusculares no músculo estriado do rato (Cardi et al., 1992).
2. Demonstração que o bloqueio neuromuscular envolve uma ação trifásica na liberação de neurotransmissores. A crotoxina bloqueia a liberação de acetilcolina na presinapse. Este bloqueio ocorre em três fases. Na primeira fase a liberação de acetilcolina diminui, possivelmente relacionada com a ligação da toxina ao receptor na membrana neural. Esta fase dura cerca de cinco minutos. Na segunda etapa, ocorre um aumento da liberação de neurotransmissores, devido ao aumento da concentração de cálcio no citoplasma do neurônio motor periférico. Esta etapa leva entre dez a trinta minutos. Na terceira etapa, ocorre a redução progressiva até o bloqueio completo na liberação de acetilcolina (Chang CC e Lee CY., 1963).

3. A demonstração do sinergismo entre os dois componentes do complexo crotoxina. Entre CA e CB, e sugeriu que a CA age como um acompanhante para CB direto no local de ação (Bon et al., 1989). Que potência a atividade biológica de CB, assegurando a interação do complexo com sítios de ligação corretas (Hawgood e Bon, 1991).
4. A confirmação da importância de actividade da PLA₂ para bloqueio neuromuscular. (Hawgood e Bon, 1991) (Figura 5). A atividade da fosfolipase A₂ também contribui para efeitos adicionais, tais como a contração do músculo liso do íleo (Muniz e Diniz, 1989), miotoxicidade (Soares et al., 2001), inflamação e dor.
5. Estudos de neutralização com antisoros, antivenenos e anticorpos monoclonais de várias investigações confirmam que a crotoxina é de fato, a toxina responsável pela letalidade (Rodriguez et al., 2006) e neurotoxicidade (Beghini et al., 2005) de venenos de subespécies de *Crotalus durissus*.

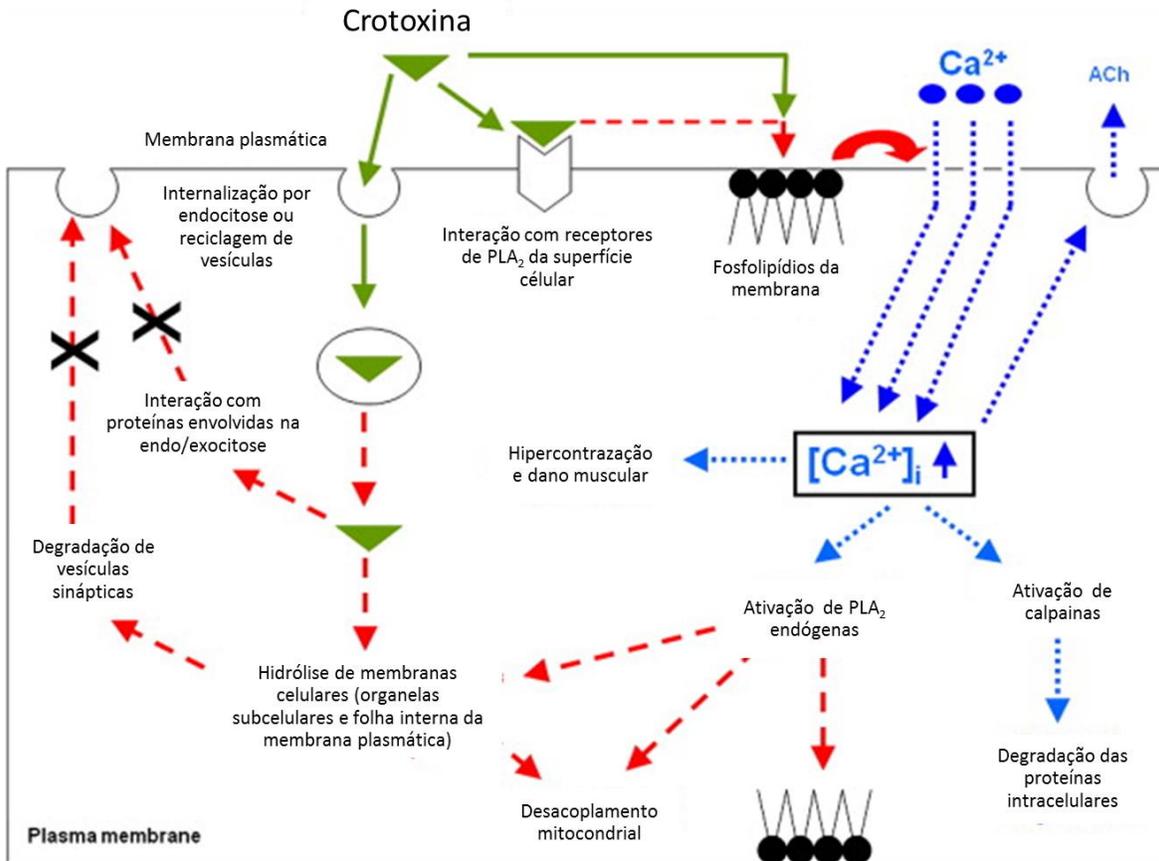


Figura 5. Esquema resumindo das principais ações intracelulares da crotoxina em nervos e músculos. Na via destacada em verde, as setas indicam a interação da crotoxina com as células ligando-se a receptores específicos da superfície celular ou é internalizado através de endocitose ou reciclagem de vesículas sinápticas; crotoxina pode também interagir directamente com a membrana plasmática para hidrolisar os fosfolípidos de membrana. Via vermelha/setas tracejadas, a crotoxina liga aos receptores da superfície celular hidrolisa os lípidos de membrana plasmática, que conduz a permeabilização da membrana, perda de seletividade iônica e entrada de Ca^{2+} extracelular. Atividade PLA_2 da crotoxina internalizada leva a sua liberação a partir de vesículas endocitadas e subsequente interação com membranas de organelas, que resulta em danos para vesículas sinápticas e desacoplamento mitocondrial (perda de Ca^{2+} homeostase e produção de ATP reduzida). Via azul/setas tracejadas, a entrada de Ca^{2+} extracelular a seguir a permeabilização da membrana aumenta marcadamente a concentração intracelular de Ca^{2+} , levando a (1) excitose da acetilcolina nos terminais nervosos, (2) hipercontratura de fibras musculares, (3) ativação da PLA_2 endógena que pode causar hidrólise adicional de fosfolípidos intracelulares e (4) a ativação de calpains envolvidas na degradação de proteínas intracelulares (miofilamentos, proteínas do citoesqueleto, etc). A ativação destas diferentes vias leva a um bloqueio neuromuscular e dano dos tecidos (necrose). X preta indica a inibição da excitose (Sampaio, 2010).

1.7 Antivenenos.

Os antivenenos são constituídos por fragmentos $F(ab')_2$ de imunoglobulinas, obtidos a partir de soros de animais hiperimunizados com doses progressivas do veneno. A grande maioria dos soros comerciais ainda são produzidos pela tecnologia tradicional em cavalos, embora alguns antisoros sejam criados em ovelhas e coelhos. Os soros constituem o único tratamento eficaz para picadas por serpentes (Theakston et al, 2003).

No caso de mordidas por espécies como a cascavél tropical, antes do advento da terapia antivenominal, foi relatada uma letalidade de mais de 50%. Com a utilização do soro e modernos tratamentos auxiliares os sintomas do envenenamento pode ser reduzido a menos de 5%.

Antiveneno continua a ser a única terapia específica. As indicações para seu uso incluem: sangramento sistêmico espontâneo, sangue incoagulável, paralisia, insuficiência renal aguda e urina negra (mioglobínúria ou hemoglobínúria). (Theakston et al, 2003).

No Brasil, os soros anticrotálico (contra o veneno das cascavéis) e antibotrópico-crotálico (contra o veneno de jararacas e cascavéis) são produzidos no Instituto Butanta (São Paulo), na FUNED (Belo Horizonte) e no Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro). Esta produção convencional do antiveneno tem uma série de problemas associados ao método aplicado, por exemplo:

- Nos países em desenvolvimento, o custo de fabricação e distribuição de soros antivenenos é um fator importante. Idealmente, esse custo deve ser coberto pelo setor público (Serviço de Saúde) e os antivenenos devem ser acessíveis e disponíveis para qualquer pessoa que tenha sido mordida ou picada e precise de tratamento.
- A necessidade de conservantes, tais como fenol e cresol, no produto final é também discutida, se considera que sua utilização é necessária para prevenir o crescimento microbiano em soros bruto e não fabricados assepticamente. Embora o uso de conservantes para esta finalidade deveria, idealmente, ser eliminado gradualmente mas seria necessário uma melhoria nas instalações de fabricação.

- A variação de veneno dentro da mesma espécie tanto localmente como de região para região também é observada e tem que ser levada em consideração na produção de soros efetivos. Devem ser desenvolvidas preparações de referência para países ou regiões.

O uso de soros antiofídicos pode apresentar alguns efeitos adversos que tem sido descritos no uso da soroterapia. Atualmente esses efeitos são divididos em precoces e tardios (Lalloo and Theakson, 2003).

Os efeitos precoces ocorrem logo após o início de administração de soro, começando entre 10 minutos até três horas após a aplicação do produto. A maior incidência é de reações leves, incluindo urticária, náuseas, diarreias, dor de cabeça, arrepios e febre. Em alguns casos pode haver uma evolução para um quadro clínico mais grave, como edema de glote e hipotensão devido ao choque (Moran et al, 1998). Esses efeitos são relacionados por alguns autores à ativação do complemento pelo uso de imunoglobulinas heterólogas (García et al, 2002). Embora a ativação do complemento ocorra em modelos animais, ela não foi observada na maioria dos pacientes que desenvolveram reações precoces (Malasit et al, 1986).

Os efeitos tardios aparecem algum tempo após o tratamento com o soro e a reversão do efeito do envenenamento o paciente pode desenvolver uma síndrome que é conhecida como “mal do soro”. Esse efeito tardio ao uso do soro ocorre cerca de 7 a 14 dias após o início do tratamento, sendo caracterizada por um aumento de temperatura, com uma elevação da proteinúria, e hipersensibilidade cutânea. A explicação para esses efeitos é a formação de anticorpos humanos contra o anticorpo equino e contra o complexo anticorpo veneno (Kricka, 1999).

Todas estas causas levam a necessidade de se ter novas abordagens na produção de antivenenos que ajudem a melhorar os métodos com que se abordam os casos de envenenamentos por animais peçonhentos.

1.8 Predição de epítomos

Durante vários anos, a noção de vacinas profiláticas foi baseada na exposição a formas não patogênicas de um determinado patógeno com a finalidade de obter uma resposta imune protetora contra exposições anteriores. Tradicionalmente as vacinas são constituídas de organismos atenuados ou inativados, administradas de forma injetável. Contudo, o uso de organismos completos pode trazer como desvantagem respostas indesejadas no hospedeiro. A medida que o conhecimento dos alvos da resposta imune tem aumentado, são utilizadas abordagens reducionistas para a formulação de vacinas, como compostos antigênicos específicos e epítomos imunodominantes (Purcell et al., 2006).

Os epítomos são sítios específicos dos antígenos, reconhecidos por linfócitos, capazes de induzir uma resposta imune. Quando ocorre a imunização com uma proteína, a maioria dos linfócitos são específicos para algumas sequências de aminoácidos, denominadas epítomos imunodominantes (Akram e Inman, 2012). Em alguns casos, a formação de epítomos em uma proteína depende somente da estrutura primária sendo denominados epítomos lineares, em outros casos, a formação do epítomo depende da estrutura tridimensional devido a justaposição de aminoácidos e são denominados epítomos conformacionais (Gershoni et al., 2007).

O papel principal dos epítomos no reconhecimento pelo sistema imune, atraiu a atenção para o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas para a predição de epitopes, devido às vantagens sobre o uso de proteínas como: ausência de material infeccioso, especificidade da resposta imune, ausência de recombinação genética, produção econômica e em grande escala, fácil controle de qualidade através de técnicas de espectrometria de massa, facilidade de transporte através de liofilização das preparações, entre outros (Jackson et al., 2006).

1.9 Epítomos de proteínas para linfócitos B

A maioria dos epítomos presentes em uma proteína são descontínuos e são identificados por técnicas laboriosas de cristalografia de raios X do complexo antígeno-anticorpo. Porém, epítomos descontínuos usualmente possuem segmentos contínuos que ligam aos anticorpos e, devido as limitações da identificação e síntese dos epítomos descontínuos, os epítomos sintéticos contínuos são usados no estudo das propriedades imunológicas das proteínas, diagnóstico de doenças e como candidatos para vacinas sintéticas. (Regenmortel, 2001).

Os epítomos são interessantes pois, podem ser reproduzidos em peptídeos usando tecnologias, tais como peptídeos sintéticos e phage-display. Estas moléculas, após ser utilizadas em imunização, permitem gerar anticorpos o que é útil para o estudo em vacinas, biosensores, métodos imuno-terapêuticos e moléculas para diagnóstico.

Em virtude da importância da imunidade humoral, existem algoritmos bioinformáticos desenvolvidos para prever os epítomos contínuos dos linfócitos B (Saha e Raghava, 2006). Os métodos aplicados utilizam critérios que definem a predição, tais como hidrofobicidade (Parker et al., 1986), flexibilidade (Westhof et al., 1984; Karplus & Schulz, 1985) acessibilidade ao solvente (Emini et al., 1984) e presença de possíveis motivos estruturais (Pellequer et al., 1993). Determinar epítomos através da predição e das análises computacionais pode proporcionar o desenho de uma molécula capaz de substituir um antígeno no processo de produção de anticorpos. Tal molécula pode ser sintetizada ou clonada num vetor de expressão. Alguns autores sugerem que o tamanho ideal para estes peptídeos que apresentam imunogenicidade esteja entre 10-15 aminoácidos (Sivalingam e Shepherd, 2012).

Atualmente, os epítomos contínuos de linfócitos B determinados experimentalmente podem ser armazenados em um banco de dados, como o denominado BCIEP, que proporciona informações como sequência do epítomo, proteína a qual pertence e métodos experimentais utilizados para monitorar o potencial imunogênico do epítomo (Saha et al., 2005). Utilizando a informação disponível no banco de dados BCIEP, Saha e

colaboradores criaram um algoritmo preditivo para epítomos para linfócitos B, disponibilizado gratuitamente, com 65.93% de precisão (Saha e Raghava, 2006).

1.10 Mapeamento de epítomos

O padrão ouro para a determinação de epítomos é obtido pelo método de cristalografia de raios X, através do qual é possível visualizar em alta resolução os detalhes moleculares da interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Porém, a técnica é complexa e depende da obtenção de proteínas altamente purificadas e da formação de cristais de alta qualidade (Gershoni et al., 2007).

Estudos realizados pelo grupo francês de Pierre Tougard do Instituto Pasteur confirmou, por diversos estudos utilizando difração de raios X dos complexos Ag-Ac, que o epitopo é constituído por cerca de 10 a 20 aminoácidos. Este resultado foi mostrado pela primeira vez através da resolução por cristalografia de raios-X de um complexo Ag-Ac (Amit et al., 1985).

Ao identificar um epítomo devemos levar em conta os aminoácidos que se ligam ao anticorpo, mas também aqueles que não se ligam, também podem participar dando uma conformação adequada a essa molécula, de modo que ela possa estar apta a se ligar ao anticorpo. Assim, em um epítomo existe alguns aminoácidos que são considerados mais importantes, denominados críticos ou de contato., Quando um deles é substituídos, modificam a conformação do epítomo alterando ou até impedindo sua ligação ao anticorpo (Haste et al., 2006). Identificar estes aminoácidos críticos no epítomo é importante no desenho de peptídeos e proteínas voltadas para a produção de anticorpos (Trier et al., 2012).

Os epítomos contínuos, em sua maioria, são descritos por conterem de 4 a 5 resíduos de aminoácidos que são importantes na ligação e, assim definem a especificidade da interação com o anticorpo e os outros aminoácidos que conformam a região epitópica. Além disso, estes realizam uma função espaçadora, e podem ser substituídos por aminoácido de iguais características estruturais (Geysen et al., 1988).

Hoje em dia, a investigação científica está baseada em técnicas que permitam realizar um monitoramento rápido e replicável, reduzindo as dimensões do ensaio, a quantidade da amostra e os custos. Com o avanço da tecnologia dos microarranjos veio a implementação de técnicas como a síntese paralela de pequenas sequências do antígeno em uma membrana, denominada SPOT síntese ou método spot, que possibilita avaliar a reação de todos os spots, cada um contendo um determinado epítipo, simultaneamente (Frank, 1992).

O conceito básico do método spot consiste em reações químicas podem ocorrer até a conclusão em um suporte sólido como uma membrana de celulose. Quando cada segmento do antígeno é adsorvido pela membrana em forma de spot, ocorre a formação de reatores individuais separados fisicamente na superfície. Adicionando soluções e reagentes subsequentes é desenvolvida a reação química que pode ser revelada utilizado qualquer método de detecção, o mais utilizado é o conjugado com fosfatasa alcalina e MTT como sustrato, ou repórter, estabelecido em outras técnicas como ELISA ou Western blot, mostrando para cada spot uma reação específica que permite identificar os epítipos, em um antígeno, que induzem a produção de anticorpos (Frank, 2002).

1.11 Implantes subcutâneos

Novos protocolos tem sido descritos para imunização de camundongos. Os procedimentos baseia-se na implantação subcutânea de algum material condutor que contem o antígeno, Lima e colaboradores, 1999 descrevem como imunizar animais com disco de esponjas de poliéster-poliuretano conjugadas com antígeno, cortadas e implantadas subcutaneamente dentro do animal. Os dados obtidos após a 3ª semana de imunização indicaram que foram obtidas respostas imunes tanto celulares como humorais.

Em ensaios de imunização passiva, realizados por Lathuilière e colaboradores em 2016, empregando um dispositivo de encapsulação permeável a macromoléculas, as células encapsuladas são geneticamente manipuladas para segregar níveis elevado de anticorpos, o que leva à liberação continua de anticorpos. Encontrando resultados que suportam o uso de implantes de células encapsuladas para imunoterapia passiva.

A celulose é um biopolímero linear natural, que consiste na montagem de nanofibrilas de celulose numa ordem hierárquica. A nanocelulose, em particular, mostram grande promessa como um material avançado rentável para aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade. Além disso, com a sua funcionalidade química podem ser facilmente modificados para produzir produtos úteis. Já tem sido aplicadas em implantes médicos, engenharia de tecidos, administração de fármacos, cicatrização de feridas, diagnósticos e outras aplicações médicas com exemplos reais neste campo (Dumanli, 2016).

2. Justificativa

Serpentes pertencentes aos gêneros *Bothrops spp.* e *Crotalus spp.* são responsáveis por quase 100% dos acidentes por picadas de serpentes no Brasil. Os acidentes causados por estas serpentes têm relativamente alta taxa de mortalidade (Pinho, F. e Pereira, D., 2001). Especificamente, todas as serpentes do gênero *Crotalus* são conhecidas como cascavéis sul-americanas e o complexo da crotoxina pode corresponder até 65% do peso seco do veneno, sendo considerado o principal componente tóxico (Moio, 2012).

O uso tradicional de venenos brutos durante todas as etapas da produção de soros anti-venenos apresentam problemas como: animais imunizados podem sofrer com toxicidade do veneno injetado, mimetizando quadro de envenenamento e diminuindo suas expectativas de vida. Produção de anticorpos contra moléculas inócuas do veneno e a extensa variabilidade inter e intraespecífica na composição bioquímica de venenos de serpentes que pode afetar a eficácia neutralizante dos soros antiofídicos (Harrison et al 2011).

Pele esposto anteriormente, é de suma relevância a utilização de novas tecnologias para buscar antígenos alternativos, principalmente proteínas atóxicas ou peptídeos sintéticos mimetizando epítomos das principais toxinas de cada veneno para serem utilizados na produção de antivenenos.

Assim, a identificação de epítomos é uma parte importante na busca de imunógenos alternativos, visto que algumas dessas biomoléculas podem ser desprovidas de toxicidade pelo fato que são peptídeos pequenos. Desta forma nesta dissertação, usamos três metodologias diferentes para identificar epítomos. Após síntese química dos correspondentes epítomos, estes serão validados, através da imunização de camundongos, na produção de anticorpos que reconhecem a toxina com a qual tem relação e eventualmente com atividade neutralizante do veneno. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado, em outros venenos de aranhas e escorpiões que peptídeos mimetizando epítomos de toxinas podem ser uma alternativa interessante na produção de antivenenos (Duarte et al., 2010).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Mapeamento de epítomos da crotoxina, a principal neurotoxina do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (“cascavel sulamericana”)

3.2 Objetivos específicos

1. Mapear epítomos da crotoxina para células B, a principal toxina do veneno de *Crotalus spp*, usando métodos bioinformáticos e experimentais: SPOT-síntese e implantes subcutâneos.
2. Sintetizar peptídeos correspondentes aos epítomos mapeados e avaliar a sua capacidade antigênica/imunogênica.
3. Produzir anticorpos policlonais anti-peptídeos em camundongos.
4. Avaliar a reatividade dos anticorpos anti-peptídeos contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Venenos

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* e os respectivos soros antiveneno, foram cedidos do centro de pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias de Belo Horizonte, Brasil, guardados a -20°C.

4.2 Produções de anticorpos anti crotoxinas

A produção de anticorpos anticrotoxina, foi realizada utilizando (camundongos fêmea, da linhagem swiss). Os animais foram obtidos centro de Bioterismo do ICB-UFMG (Belo Horizonte, MG), e foram imunizados com uma injeção intramuscular de peptídeos sintéticos, seleccionados do mapeamento epítomos, seguindo o método descrito por Beghini et al., (2004).

4.3 ELISA

A quantidade de anticorpos presentes no soro é determinada pelo método de ELISA (Chavez-Olortegui et al., 1993). Cada soro foi avaliado por ELISA para verificação da presença de anticorpos anti-peptídeo de crotoxina. A técnica foi realizada em placas de microtitulação de fundo chato, sensibilizadas overnight a 4°C, com uma solução de 100 µL por poço contendo 0.5 µg de veneno de *C. durissus terrificus*, em tampão carbonato 0.5 M, pH 9.6. Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com o tampão de lavagem (0.05 M de PBS com 0.05% Tween 20), e bloqueadas durante uma hora, com 100 µL por poço da solução de bloqueio (1.6% caseína em PBS 0.15 M, pH 7.4). As placas foram lavadas novamente e incubadas, durante uma hora, com 100 µL por poço, utilizando diferentes diluições do soro. Os soros foram diluídos em (0.25% de caseína em PBS 0.15 M). Após a incubação as placas foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem e incubadas novamente, durante uma hora, com uma solução de 100 µL por poço, do anticorpo de cabra anti-mouse IgG (Sigma), conjugado à peroxidase, em uma diluição 1/10000 na solução diluente. As placas foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem e a atividade da peroxidase foi determinada com 100 µL por poço da solução do substrato

específico de OPD (Sigma). A reação foi interrompida com 25 µL por poço de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) e foi medida a densidade óptica, a 450 nm, usando um leitor de ELISA automático.

4.4 Predição de epítomos

4.4.1 Epítomos para Linfócitos B

Foi utilizado o programa ABCpred disponível gratuitamente no site http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html desenvolvido por Saha et al. (2006). Para a predição de epítomos lineares, foi utilizado os parâmetros, Threshold setting maior que 0,7 e windows= 16 , escolhemos as sequências com maior score, e também foi utilizado o recurso gratuito IEDB disponível em <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>. Este recurso faz um cálculo do score de cada aminoácido da janela selecionada em função de parâmetros físicoquímicos como: hidrofobicidade, flexibilidade, acessibilidade, superfície exposta, polaridade e propensão antigênica de cadeias de peptídeos relacionadas com antígenos.

O objetivo do servidor ABCpred é prever de epítomo para célula B, em uma sequência de antígeno, usando rede neural artificial. Este é o primeiro servidor desenvolvido com base em rede neural recorrente, usando padrões de comprimento fixo.

4.4.2 Seleção dos epítomos através do Método Spot

A metodologia descrita a seguir, referentes à síntese dos peptídeos da crotoxina, sobre a membrana de celulose e a síntese química, foi realizada com a colaboração do Dr. Ricardo Machado de Avila da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

4.5 Síntese em membrana de celulose

A síntese paralela dos peptídeos preditos sobre a membrana de celulose foi realizada usando o método de Laune e colaboradores (2002), com as modificações de Machado de Avila e colaboradores (2011). Os aminoácidos protegidos por um grupo fluorenil-metil-oxicarbonila (Fmoc) foram ativados previamente pela mistura de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e Oxyma em dimetilformamida (DMF). Posteriormente,

foram depositados em um volume de 0,6 μ L no sintetizador automático (MultiPep Automatic Spot synthesizer-Intavis), permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana. Para retirar o grupamento protetor FMOC, associado ao grupo amino, adicionou-se uma solução a 25% de 4-metilpiperidina em DMF. A membrana foi lavada com metanol e, após secagem, foi reposicionada no sintetizador para outro ciclo. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento. Depois de cada ciclo a membrana foi lavada com uma solução de anidrido acético 10% em DMF para impedir a reatividade dos grupos NH_2 que permaneceram livres. Os ciclos se repetiram desta forma até a síntese total dos peptídeos. Ao final da síntese, os grupos protetores de cadeias laterais foram retirados pelo tratamento da membrana com uma solução de ácido trifluoracético (TFA) associado a 2.5% diclorometano, trietilsilano e água, enquanto a ligação dos peptídeos com a membrana foi mantida.

4.6 Imunoensaio de SPOT

Peptídeos cobrindo toda a sequência de aminoácidos da crotoxina de *C. durissus terrificus* foram construídos sobre uma membrana de celulose. Esses peptídeos foram testados simultaneamente quanto à sua reatividade frente a diferentes soros (contrao veneno de *C. durissus terrificus* ou contracrotoxina) produzidos em cavalos, revelados utilizando anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina e substrato MTT-BCIP. Através de um tratamento com dimetilformamida, ureia, ácido acético e β -mercaptoetanol, a membrana poderá ser regenerada e reutilizada posteriormente (Frank, 1992).

4.6.1 Reação com o soro

A membrana contendo os peptídeos sintéticos foi inicialmente lavada três vezes, durante 5 minutos, com uma solução de TBS 0.05 M, pH 7.4. Para o bloqueio foi utilizada uma solução de TBS 0.05 M com 3% de albumina sérica bovina (BSA) e 0.1% Tween 20, durante uma hora. Finalizado o tempo de bloqueio, a membrana foi lavada uma vez com a solução de lavagem (TBS 0.05 M e 0.1% Tween 20), durante 10 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada, durante duas horas, com o soro anti-veneno total de *Cdt* diluído

1000 vezes na solução de lavagem com 3% de BSA. Todas as lavagens e incubações foram realizadas sob agitação.

4.6.2 Revelação fosfatase alcalina

Após reação com o soro, a membrana foi incubada, durante uma hora, como anticorpo secundário acoplado à fosfatase alcalina, diluído 10.000 vezes em uma solução de TBS 0.05 M com 3% de BSA e 0.1% Tween 20. Após o período de incubação, a membrana foi lavada duas vezes com a solução de lavagem, durante dez minutos, e posteriormente, duas vezes com a solução do tampão citrato salino ou CBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.21% ácido cítrico mono-hidratado, pH 7). Foi adicionado o substrato contendo 120 µL de MTT (50 mg/mL), 100 µL BCIP (60 mg/mL) e 80 µL MgCl₂ 1 M, em 20 mL de CBS. Vinte minutos depois, a reação foi parada com três lavagens, de dois minutos, com água Milli-Q. Após a secagem, a imagem da membrana foi digitalizada (Laune et al., 2002).

4.6.3 Regeneração da membrana

Para reutilizações posteriores, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração: três lavagens de 10 minutos com DMF; em seguida, três lavagens de 10 minutos com reagente A (uréia 8 M + 1% de SDS + 0.1% de β-mercaptoetanol), depois foi lavada três vezes com o reagente B contendo etanol, água e ácido acético, nas proporções 50:40:10 (vol/vol/vol). Para facilitar a secagem, a membrana foi ainda lavada três vezes com metanol durante 10 minutos e armazenada a -20°C (Laune et al., 2002).

4.6.4 Imunização com implantes subcutâneos

Grupos de camundongos Swiss fêmea, de 6 a 8 semanas foram imunizados pela via subcutânea, com os spots cortados da membrana de Spot da crotoxina. A sequência de cada spot está descrito nas Tabelas 2 e 3. Os animais foram imunizados apenas uma vez por o método cirúrgico a fim de introduzir o spot seguindo o método de Lima et al 1999, com algumas modificações. Este procedimento foi submetido e autorizado pelo CEUA (445/2015). O soro foi coletado antes da imunização, e foi denominado pré-imune, e 30 dias após da cirurgia da colocação do implante. Posteriormente, foram realizados ensaios

de ELISA para teste da reatividade do soro frente ao veneno total de *Cdt*, seguindo o método descrito na seção 4.3, utilizando 0,5 µg de veneno crotalico por poço.

Como controles negativos, 5 camundongos Swiss também foram submetidos á cirurgia, porém receberam fragmento de membrana de sintese sem o peptídeo).

Tabela 2. Grupos experimentais da crotoxina, subunidade ácida (UniProt P08878)

Nº do spot	Sequência do peptídeo no spot	Nº do spot	Sequência do peptídeo no spot
1	SSYGCYCGAGGQGWP	16	RQEDGEIVCGEDDPC
2	GCYCGAGGQGWPQDA	17	DGEIVCGEDDPCGTQ
3	CGAGGQGWPQDASDR	18	IVCGEDDPCGTQICE
4	GGQGWPQDASDRCCF	19	GEDDPCGTQICECDK
5	GWPQDASDRCCFEHD	20	DPCGTQICECDKAAA
6	QDASDRCCFEHDCCY	21	GTQICECDKAAAICF
7	SDRCCFEHDCCYAKL	22	ICECDKAAAICFRNS
8	CCFEHDCCYAKLTGC	23	CDKAAAICFRNSMDT
9	EHDCCYAKLTGCDPT	24	AAAICFRNSMDTYDY
10	CCYAKLTGCDPTTDV	25	ICFRNSMDTYDYKYL
11	AKLTGCDPTTDVYTY	26	RNSMDTYDYKYLQFS
12	TGCDPTTDVYTYRQE	27	MDTYDYKYLQFSPEN
13	DPTTDVYTYRQEDGE	28	YDYKYLQFSPENCQG
14	TDVYTYRQEDGEIVC	29	KYLQFSPENCQGESQ
15	YTYRQEDGEIVCGED	30	LQFSPENCQGESQPC

Tabela 3. Grupos experimentais da crotoxina, subunidade básica (UniProt P0CAS6)

N ^o do spot	Sequência do peptídeo no spot	N ^o do spot	Sequência do peptídeo no spot
1	SLLQFNKMIKFETRK	20	NTKWDIYRYSLKSGY
2	QFNKMIKFETRKNV	21	WDIYRYSLKSGYITC
3	KMIKFETRKNVPPFY	22	YRYSLKSGYITCGKG
4	KFETRKNVPPFYAFY	23	SLKSGYITCGKGTWC
5	TRKNVPPFYAFYGCY	24	SGYITCGKGTWCKEQ
6	NAVPPFYAFYGCYCGW	25	ITCGKGTWCKEQICE
7	PPFYAFYGCYCGWGGR	26	GKGTWCKEQICECDR
8	AFYGCYCGWGRRRP	27	TWCKEQICECDRVAA
9	GCYCGWGRRRPKDA	28	KEQICECDRVAAECL
10	CGWGRRRPKDATDR	29	ICECDRVAAECLRRS
11	GGRRRPKDATDRCCF	30	CDRVAAECLRRSLST
12	RRPKDATDRCCFVHD	31	VAAECLRRSLSTYKN
13	KDATDRCCFVHDCCY	32	ECLRRSLSTYKNGYM
14	TDRCCFVHDCCYEKV	33	RRSLSTYKNGYMFYP
15	CCFVHDCCYEKVTKC	34	LSTYKNGYMFYPDSR
16	VHDCCYEKVTKCNTK	35	YKNGYMFYPDSRCRG
17	CCYEKVTKCNTKWDI	36	GYMFYPDSRCRGPSE
18	EKVTKCNTKWDIYRY	37	MFYPDSRCRGPSETC
19	TKCNTKWDIYRYSLK		

4.7 Modelagem de peptídeos

O modelo tridimensional dos peptídeos que não podem ser encontrados no cristal da proteína referência foi construído através da modelagem estrutural comparativa, ou modelagem por homologia estrutural empregando o SwissModel. A modelagem por homologia é uma metodologia adequada à predição de estruturas tridimensionais de proteínas a partir da estrutura cristalográfica de uma proteína homóloga com identidade sequencial >30% e boa resolução. Esta técnica computacional baseia-se nas observações empíricas que proteínas compartilhando sequências com uma alta identidade de aminoácidos exibem estruturas tridimensionais com o mesmo enovelamento e que a

estrutura tridimensional de proteínas é mais conservada que a estrutura primária (Santos Filho e Alencastro, 2003). A análise da estabilidade do peptídeo modelado pode ser feita empregando *Qmean serve* que estima a qualidade absoluta do modelo.

Sendo assim, uma proteína de estrutura conhecida pode ser usada como molde para a construção da estrutura tridimensional de uma proteína homóloga, a partir de sua sequência de aminoácidos (Santos Filho e Alencastro, 2003).

4.8 Síntese Química de Peptídeos

Para produzir os peptídeos de interesse em sua forma solúvel, foi utilizado o método desenvolvido por Merrifield, 1969. Ele consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento FMOC (fluorenil-metiloxicarbonila), sua cadeia lateral também está protegida por um grupo protetor para evitar reações indesejadas. O suporte sólido insolúvel normalmente é uma resina que também se encontra protegida pelo FMOC.

Foi utilizada a resina Rink Amide como suporte sólido. O tubo de síntese contendo a resina foi lavado 3 vezes com 5ml de DMF e em seguida foi adicionada piperidina 20%, deixando sob agitação por 20 minutos para clivar o FMOC da resina. Após novas 3 lavagem com DMF, iniciou-se a etapa de acoplamento. Nesta etapa, o primeiro aminoácido (100 μ M) a ser acoplado foi adicionado junto com os ativadores da sua função carboxila, o Oxyma (100 μ M) e o DIPC (100 μ M) e deixado por 30 minutos sob agitação.

Após acoplagem, três novas lavagens intercalado DMF e metanol foram realizados e é iniciada a etapa de desproteção. Nesta etapa o grupamento FMOC do aminoácido acoplado é removido com a presença de piperidina 20%, por 20 minutos. Ao final desta etapa, 3 novas lavagens com DMF são realizadas e o protocolo de acoplagem do segundo aminoácido é reiniciado. Este ciclo de acoplagem/desproteção é feito até que todos os aminoácidos do peptídeo a ser sintetizado estejam acoplados.

Após o término do último ciclo, o peptídeo já sem o grupamento FMOC do último aminoácido foi removido da resina por uma etapa chamada de clivagem. Nesta etapa também se elimina os grupamentos protetores da cadeia lateral. Para isto, o peptídeo foi incubado por 3 horas com uma solução de clivagem contendo 2.5% de água destilada + 2,5% de TES (triethylsilano) em TFA (ácido trifluoracético). Em seguida esta solução é filtrada. A solução filtrada foi precipitada com éter etílico gelado obtendo assim o peptídeo. Após centrifugação o éter foi eliminado e o peptídeo é ressuspendido em água mili-Q e liofilizado.

4.9 Espectrometria de massa

As análises por espectrometria de massa foram realizadas no Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais utilizando o instrumento Autoflex-III MALDI-TOF- TOF™ (Bruker Daltonics) no modo refletor/positivo controlado pelo software FlexControl™. A calibração do instrumento foi obtida usando o Calibration Standard II (Bruker Daltonics) como referência e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. Uma gota da mistura contendo a amostra a ser analisada e a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, na proporção de 1:1 foi colocada numa placa MTP AnchorChip™ 400/384 (Bruker Daltonics). Após a secagem da gota, a placa foi levada ao aparelho para análise.

4.10 Polimerização dos peptídeos com glutaraldeído

Os peptídeos sintéticos foram solubilizados em PBS 0.15 M, pH 7.4, a uma concentração de 2 mg/mL e foram ligados entre si com glutaraldeído 1% seguindo o protocolo de Machado de Avila e colaboradores (Machado de Avila et al., 2004). Posteriormente foi verificado o volume final e foi adicionado, gota a gota, a mesma quantidade de glutaraldeído 1% e deixado em agitação durante uma hora a 4°C. Interrompendo a reação com borohidreto de Sódio numa concentração de 10mg/mL, os polímeros de peptídeos ligados foram armazenados a -20°C ou utilizados para realizar as imunizações posteriores.

4.11 Imunocaracterização com Dot blot

O experimento de Dot Blot seguiu o proposto por Wang e colaboradores (2015), com algumas modificações. Para a realização do Dot Blot, uma membrana de nitrocelulose foi colocada de molho por 10 minutos em água destilada, e logo posicionada no suporte para Dot blot.

Cada um dos peptídeos foram aplicados na membrana (50 µg/poço) e incubados a 37°C por duas horas. O bloqueio da membrana foi feito utilizando-se PBS Tween 0,3% por uma hora, sob agitação. Após lavar a membrana com PBS Tween 0,05% três vezes por cinco minutos, sob agitação, colocou-se os anticorpos diluídos em PBS por 1,5 horas, sob agitação. Realizou-se nova lavagem com PBS Tween 0,05% três vezes por cinco minutos, e colocou-se o conjugado diluído em PBS por 1h.

Lavou-se novamente a membrana com PBS Tween 0,05% três vezes por cinco minutos e com PBS duas vezes por cinco minutos. Após esses procedimentos, os peptídeos reativos foram detectados utilizando DAB/cloronaftol de acordo com as instruções do fabricante.

4.12 Imunização com peptídeos sintéticos

Após a coleta do soro pré-imune, camundongas fêmea swiss pesando em torno de 20 gramas divididas em grupos de 5 camundongos que receberam injeções subcutâneas (s.c.) de 0,1 mg de peptídeo diluído em adjuvante completo de Freund. Cada grupo recebeu um peptídeo polimerizado diferente, e o grupo controle recebeu um peptídeo não reativo. Quatro reforços foram dados em intervalos de 14 dias, via subcutânea, com 0,1 mg de peptídeo em adjuvante incompleto de Freund. O soro imune foi coletado uma semana após o último reforço.

5. Resultados

5.1 Predição de epítomos lineares na crotoxina para linfócitos B

A predição de epítomos da crotoxina para linfócito B das proteínas de interesse foi realizado através do programa ABCpred, disponível gratuitamente no site http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html e desenvolvido por Saha e colaboradores (2006), e também do algoritmo Emini Surface Accessibility Prediction desenvolvido por Emini e colaboradores 1985, disponível no site gratuito IEDB <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>. Para a predição de epítomos lineares para linfócitos B, utilizando ambos programas, foi empregado os parâmetros de Threshold setting maior que 0,7 e windows = 16, e foram escolhidas as sequências com score maior a 0,70. Desta forma foram preditos 11 epítomos para a crotoxina subunidade ácida (CA), (UniProt P08878) e 11 epítomos para a subunidade básica (CB), (UniProt POCAS6) utilizando o programa ABCpred (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Epítomos preditos para Linfócitos B da subunidade ácida (CA) pelo programa ABCpred.

Rank	Sequência	Posição	Score	pI	MW
1	DRCCFEHDCCYAKLTG	60-75	0.89	5.38	1864.11
1	YGCYCGAGGQGWPQDA	43-58	0.89	3.80	1632.74
2	DGEIVCGEDDPCGTQI	89-104	0.88	3.33	1650.75
2	GWPQDASDRCCFEHDC	53-68	0.88	4.22	1868.99
3	RSGISYYSSYGCYCGA	34-49	0.87	8.02	1736.89
4	TTDVYTYRQEDGEIVC	79-94	0.85	3.92	1892.02
4	HDCCYAKLTGCDPTTD	66-81	0.85	4.41	1742.91
4	CFRNSMDTYDYKYLQF	114-129	0.85	5.95	2094.34
5	GSLVEFETLMMKIAGR	19-34	0.79	6,01	1782.15
6	DPCGTQICECDKAAAI	98-113	0.78	4.03	1637.86
7	KYLQFSPENCQGESQP	122-137	0.72	4.53	1855.01

Tabela 5. Epítomos preditos para Linfócitos B da subunidade básica (CB) pelo programa ABCpred.

RanK	Sequência	Posição	Score	pI	MW
1	CYCGWGGRRRPKDATD	26-42	0.91	8.90	1841.05
2	CGKGTWCKEQICECDR	75-91	0.90	6.15	1859.14
3	PKDATDRCCFVHDCCY	36-52	0.89	5.30	1876.12
4	YSLKSGYITCGKGTWC	66-82	0.88	8.82	1767.05
5	CFVHDCCYEKVTKCNT	44-60	0.87	6.72	1893.20
6	TKCNTKWDIYRYSLKS	55-71	0.83	9.51	2006.31
7	KNGYMFYPDSRCRGPS	104-120	0.82	9.19	1878.11
8	KEQICECDRVAAECLR	82-98	0.78	4.87	1866.16
9	RSLSTYKNGYMFYPDS	98-114	0.75	8.43	1929.13
10	QFNKMIKFETRKNVP	4-20	0.72	10.29	1951.32
11	FETRKNVPFYAFYGC	11-27	0.71	8.18	1913.18

Empregando a ferramenta Emini, foram preditas duas regiões como possíveis epítomos da subunidade ácida figura 6, e quatro regiões da subunidade básica mostradas na Figura 7.

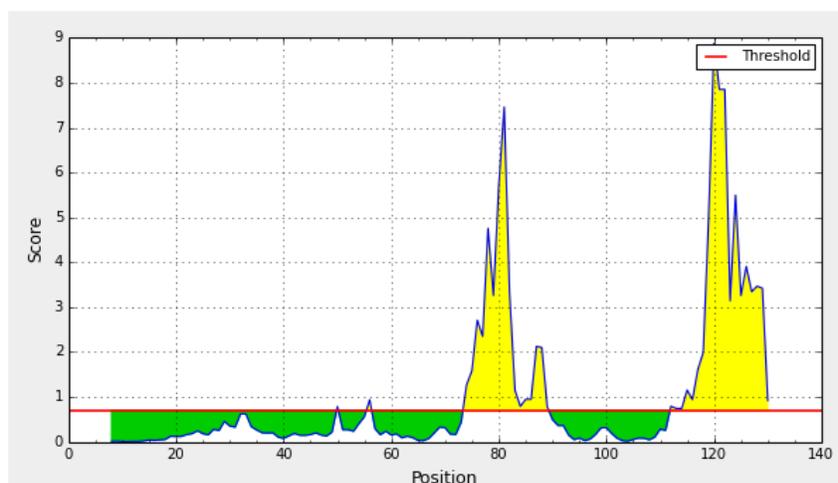


Figura 6. Representação das regiões de CA. Preditas como possíveis epítomos utilizando a ferramenta online Emini do IEDB Analyse Resource, em amarelo estão as regiões da proteínas que podem ser possíveis epítomos DPTTDVYTYR, pI/MW: 4.21 / 1230.30 (74-83); DTYDYKYLQFSPE pI/MW: 4.03 / 1668.78 (117-129).

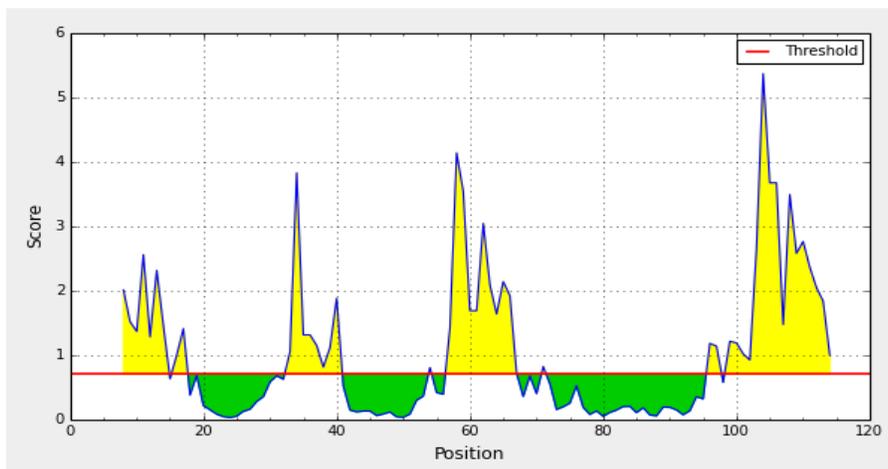


Figura 7. Representação das regiões da CB. Preditas como possíveis epitopos utilizando a ferramenta online Emini do IEDB Analyse Resource, em amarelo estão as regiões da proteínas que podem ser possíveis epitopos MIKFETR pI/MW: 8.50 / 924.13 (8-14); RRRPKDAT pI/MW: 11.71 / 999.14 (33-40); CNTKWDIYRYS pI/MW: 8.18 / 1448.62 (57-67); pI/MW 9.18 / 2585 RSLSTYKNGYMFYPDSRCRGPS (98-120)

5.2 Localização das regiões imunodominantes da crotoxina em membrana de celulose

Para a identificação dos determinantes antigênicos reconhecidos pelos anticorpos anticrotalus foram sintetizados, 67 peptídeos lineares em membrana de celulose a partir da sequência primária da crotoxina, (30 correspondem à crotapotina e 37 à fosfolipase), Figuras 9 e 10 (com 15 resíduos de aminoácidos; a cada peptídeos construído, três novos aminoácidos eram acrescentados sendo 12 sobrepostos). Ao final da síntese os peptídeos permaneceram covalentemente ligados à membrana para o ensaio de reatividade com os anticorpos.

Na membrana de spot, são mostrados os spots correspondentes à todas as proteínas do veneno de *C. d. terrificus*, essa membrana foi testada com soro pré-imune de cavalo mostrada na Figura 8A e com soro anticrotálico, e os spot mais imunogênicos presentes na membrana se podem observar na Figura 8B.

Para uma melhor caracterização das regiões imunodominantes da molécula, foram considerados como epitopos relevantes para o reconhecimento da molécula os spots com uma coloração azul (spots reativos) Figura 8B.

A membrana de spot foi testada inicialmente sem a incubação com o soro, passando do bloqueio com BSA 3% para a incubação com o anticorpo secundário acoplado à fosfatase alcalina. Após a revelação não foram visualizados spots reativos que seriam resultantes de uma interação inespecífica com o anticorpo secundário e/ou método de revelação. Posteriormente, a membrana foi testada com o soro pré-imune, obtendo-se o mesmo padrão de spots sem nenhuma cor (Figura 8A)., A membrana contém as principais proteínas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* identificadas na figura 8B, mas o trabalho está centrado só na crotoxina.

A reação da membrana de spot com o soro anticrotálico mostrou, após a revelação, spots reativos. Uma análise qualitativa desses spots permitiu selecionar aqueles que reagiram com o soro anticrotálico e que não apareceram inicialmente nos controles nas quais se usou anticorpo secundário e o soro pré-imune (Figura 8B).

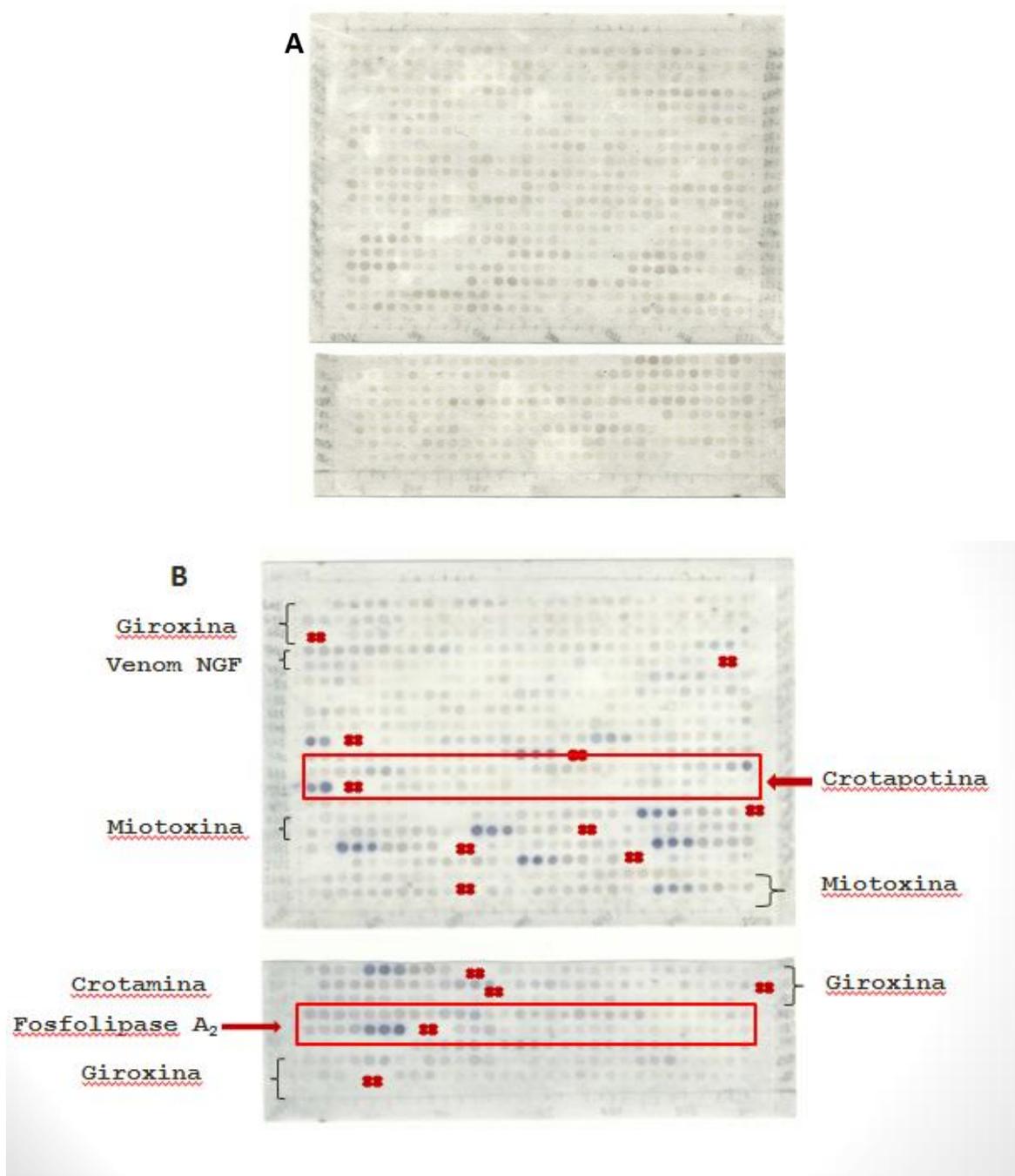


Figura 8. Membranas de spot contendo as seqüências de proteínas do veneno *Crotalus durissus terrificus*. (A) Controle negativo. Membrana testada com o soro pré-imune. (B) Membrana testada com soro anti-crotálico.

De acordo a avaliação qualitativa, foram selecionados 5 spots que reagiram positivamente com o soro anti-crotálico para os spots da crotoxina, que nesta membrana é formada pela seqüências da subunidade ácida (P08878) e a subunidade básica (POCAS6) (Figuras 9 e 10).

- Estrutura primária da crotoxina subunidade ácida (P08878).

MRALWIVAVLLVGVESLVEFETLMMKIAGRSGISYYSSYGCYCGAGGQGWPDASDRCCFEHDCCYAKL
 TGCDDPTDVTYRQEDGEIVCGEDDPCGTQICECDKAAAICFRNSMDTYDYKYLQFSPENCQGESQPC

P08878 -----DGEIVCGEDDPCGTQICECDKAAAICFRNSMDTYDYKYLQFSPENCQGESQPC 138
 871 -----YKYLQFSPENCQGES--- 15
 872 -----LQFSPENCQGESQPC 15



Figura 9. Membrana de spot contendo os peptídeos relativos à crotoxina. Spots positivos (871 e 872) da subunidade ácida, testados com soro anti-crotálico de cavalo.

- Estrutura primária da crotoxina subunidade básica (POCAS6).

SLLQFNKMIKFETRKNVPPFYAFYGCYCGWGGRRRPKDATDRCCFVHDCCYEKVTCKNTKWDIYRYSLKS
 GYITCGKGTWCKEQICECDRVAAECLRRSLSTYKNGYMFYPDSRCRGPSETC

POCAS6 ---LKSGYITCGKGTWCKEQICECDRVAAECLRRSLSTYKNGYMFYPDSRCRGPSETC 122
 485 -----YKNGYMFYPDSRCRG----- 15
 486 -----GYMFYPDSRCRGPSE-- 15
 487 -----MFYPDSRCRGPSETC 15



Figura 10. Membrana de spot contendo os peptídeos relativos à crotoxina. Spot positivos (485, 486, e 487) da subunidade básica, testados com soro anti-crotálico de cavalo.

As regiões C-terminal na estrutura 3D da crotoxina, foram localizadas, com a finalidade de ter informação conformacionais desta região., Na Figura 11 pode-se observar, em vermelho, a região C-terminal da subunidade básica, a qual apresenta propriedades básicas e boa solubilidade em água. Em contrapartida, a região C-terminal da subunidade ácida não se encontra cristalizada, não sendo possível localizá-la na estrutura 3D da proteína.

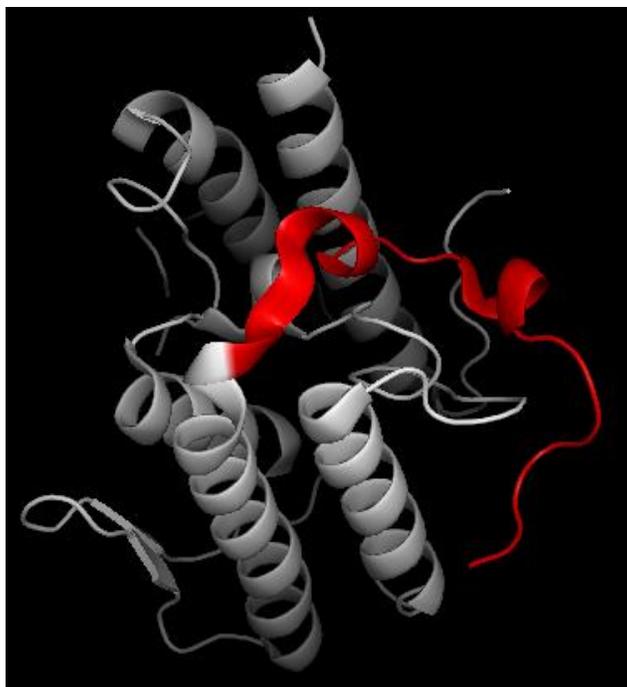


Figura 11. Estrutura 3D da região C-terminal da subunidade básica da crotoxina. Os aminoácidos identificados pelo ensaio de membrana de spot são destacados em vermelho., Esta região é formada por um loop e uma parte da hélice B.

5.3 Imunização com disco de membrana de celulosa

Camundongos Swiss, fêmeas, foram imunizados com discos cortados da membrana de spot que contem o peptídeo seleccionado, introduzidos subcutaneamente de método cirúrgico, no qual os spots são implantados na região dorsal superior dos camundongos., Cada animal recebeu um spot, com uma sequência específica como se mostra nas tabelas 2 e 3. Os animais foram monitorados por um intervalo de tempo de 3 meses, sendo sangrados a cada mês para testar a resposta de anticorpos por ELISA frente a veneno de *C. d. terrificus* obtendo os seguintes resultados para cada um dos spot.

Pelo ensaio de ELISA indireta (Figuras 12 e 13) foi verificado que os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer o veneno total de *C durissus terrificus*. As sequências de aminoácidos dos spot imunogênicos pelo teste de ELISA foram localizadas na estrutura 3D da crotoxina.

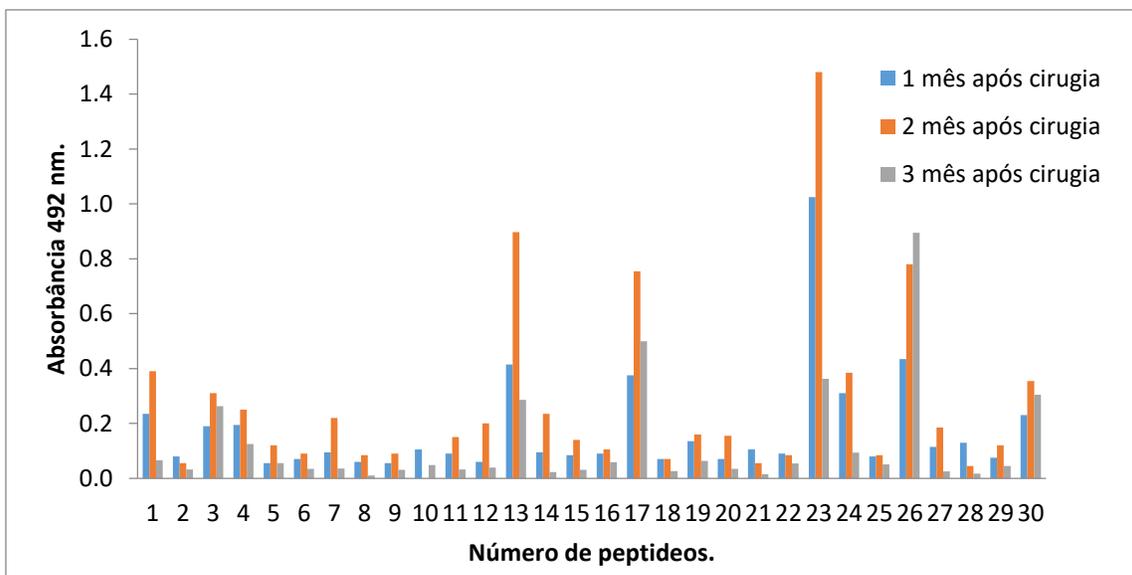


Figura 12. Reatividade dos soros dos camundongos imunizados. Com pots correspondentes à subunidade ácida da crotoxina. A reatividade foi avaliada, ao longo do tempo por ensaio de ELISA. O soro foi testado frente ao veneno total de *C durissus terrificus*.

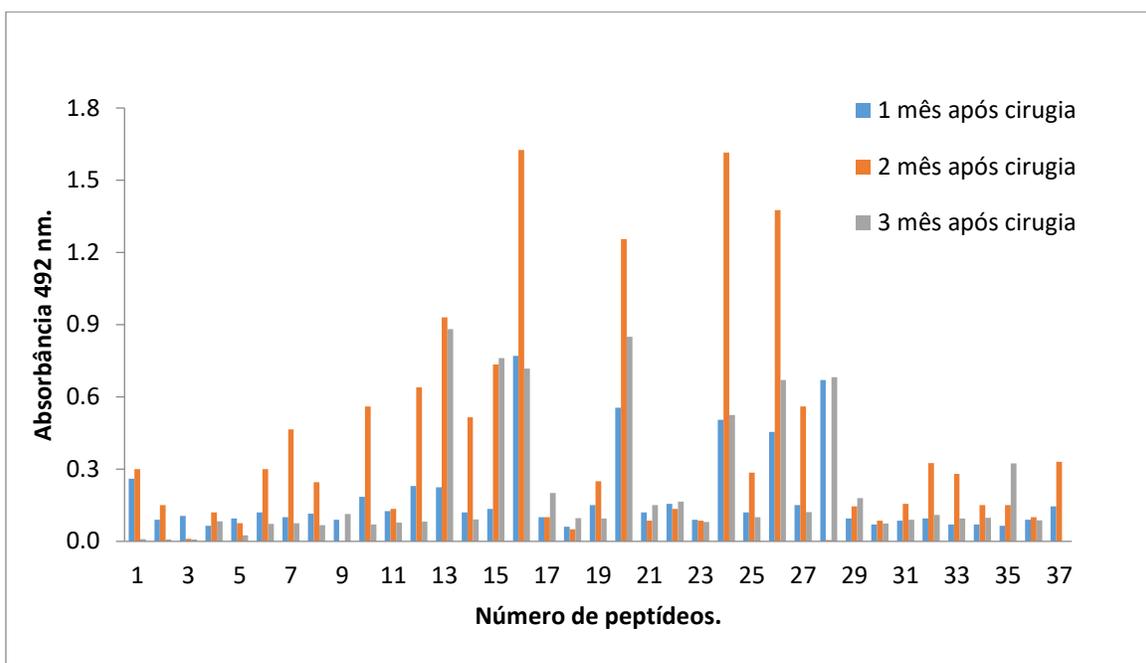


Figura 13. Reatividade dos soros dos camundongos imunizados. Com spots correspondentes à subunidade básica da crotoxina. A reatividade foi avaliada, ao longo do tempo por ensaio de ELISA. O soro foi testado frente ao veneno total de *C durissus terrificus*.

Para os spots que no primeiro mês tiveram uma reação superior a 0,4 de absorbância foi demonstrada sua localização na estrutura 3D da proteína, empregando métodos

computacionais. Para a subunidade ácida demonstrou-se a localização dos spots número 13, 17, 23 e 26, e para a subunidade básica os spots 16, 20, 24, 26 e 28. Nas tabelas 6 e 7 são mostradas a sequências dos spots e alguns seus parâmetros físico-químicos.

Tabela 6. Spot reativos da subunidade ácida.

Número do spot	Sequência	pI	Massa molecular (Dalton)	Carga	Hidrofobicidade
13	DPTTDVYTYRQEDGE	3.77	1788.8	Negativa	Hidrofilico
17	DGEIVCGEDDPCGTQ	3.33	1537.6	Negativa	Hidrofilico
23	CDKAAAICFRNSMDT	5.95	1645.8	Neutro	Hidrofilico
26	RNSMDTYDYKYLQFS	5.96	1931.1	Neutro	Hidrofilico

Tabela 7. Spots reativos da subunidade básica.

Número do spot	Sequência	pI	Massa molecular (Dalton)	Carga	Hidrofobicidade
16	VHCCYEKVTCKNTK	7.92	1771.0	Positivo	Hidrofilico
20	NTKWDIYRYSLKSGY	9.40	1894.1	Positivo	Hidrofilico
24	SGYITCGKGTWCKEQ	7.77	1660.8	Positivo	Hidrofilico
26	GKGTWCKEQICECDR	6.16	1756.0	Neutro	Hidrofilico
28	KEQICECDRVAAECL	4.16	1709.9	Negativo	Hidrofilico

A Figura 14. Mostra as regiões imunogênicas identificadas para a subunidade ácida pelo método de implante subcutâneo na estrutura 3D do cristal da crotoxina (PDB 3R0L). Observa-se nas figuras que a sequência de aminoácidos dos spots selecionados estão localizados na superfície da proteína. Os spots 17, 23 e 26 mostrados na Figura 14A-14F. Entretanto não foi possível localizar na estrutura 3D (3R0L), a sequência do spot 13, visto que o complexo crotoxina tem uma região não cristalizada, ao carregar o modelo cristalográfico da crotoxina no programa Pymol, foi achado que tem pequenas regiões da subunidade ácida não cristalizadas. Dessa forma, foi necessário fazer uma modelagem estrutural desse spot que é mostrada no próximo apartado (página 42). A figura 15 mostra os spots imunogênicos da subunidade básica, observa-se nas figuras que a sequência de

aminoácidos dos spot selecionados estão localizados na superfície da proteína. Spots 16, 20, 24, 26, e, 28 Figura 15A-15J.

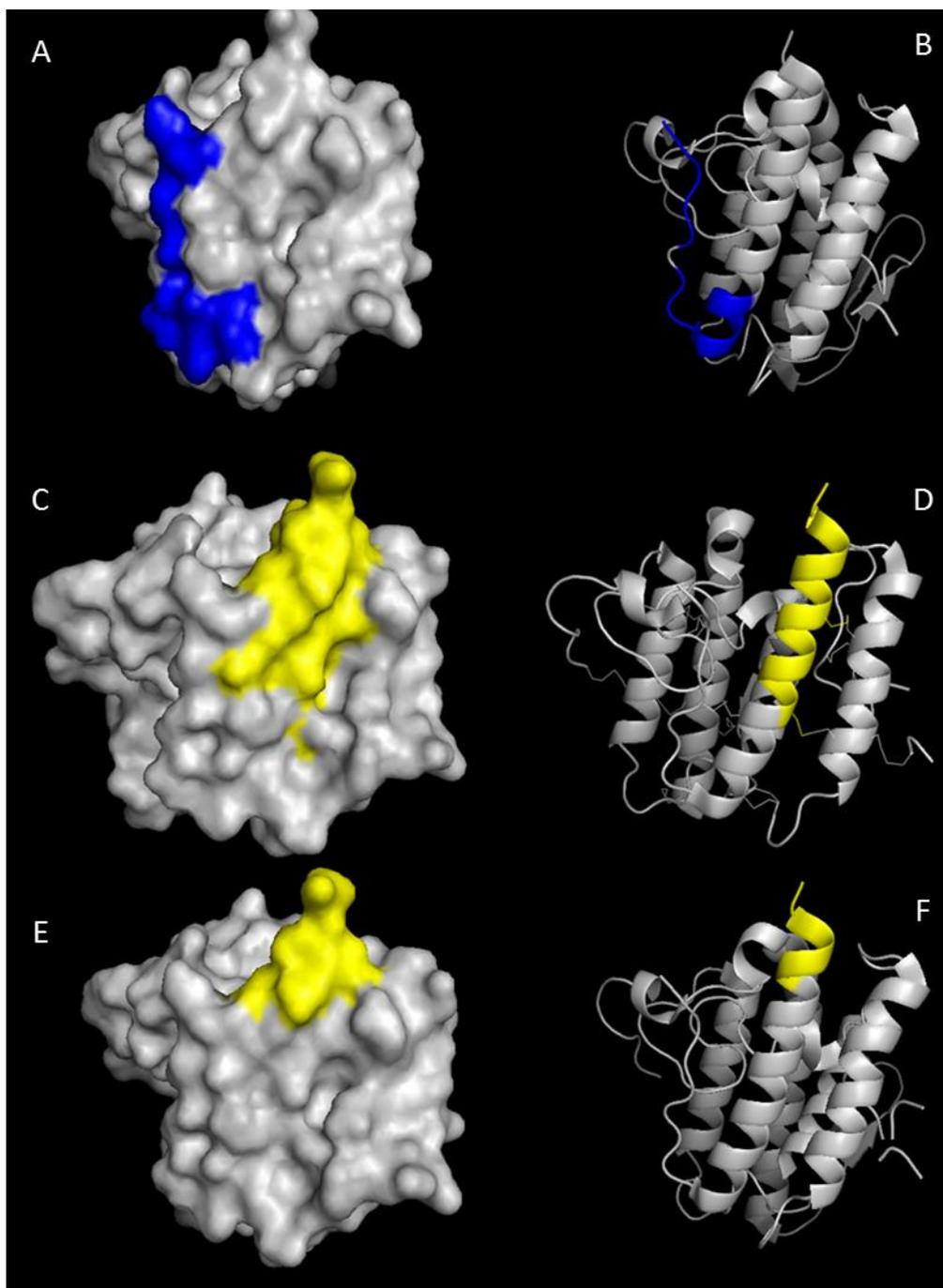


Figura 14. Visualização da estrutura 3D do complexo crotoxina em duas configurações diferentes. As seqüências dos spots imunogênicos da subunidade ácida (regiões coloridas) são mostradas na estrutura 3D. (A) e (B), spot numero 17, em azul, (C) e (D) spot número 23, em amarelo, (E) e (F) spot número 26, em amarelo.

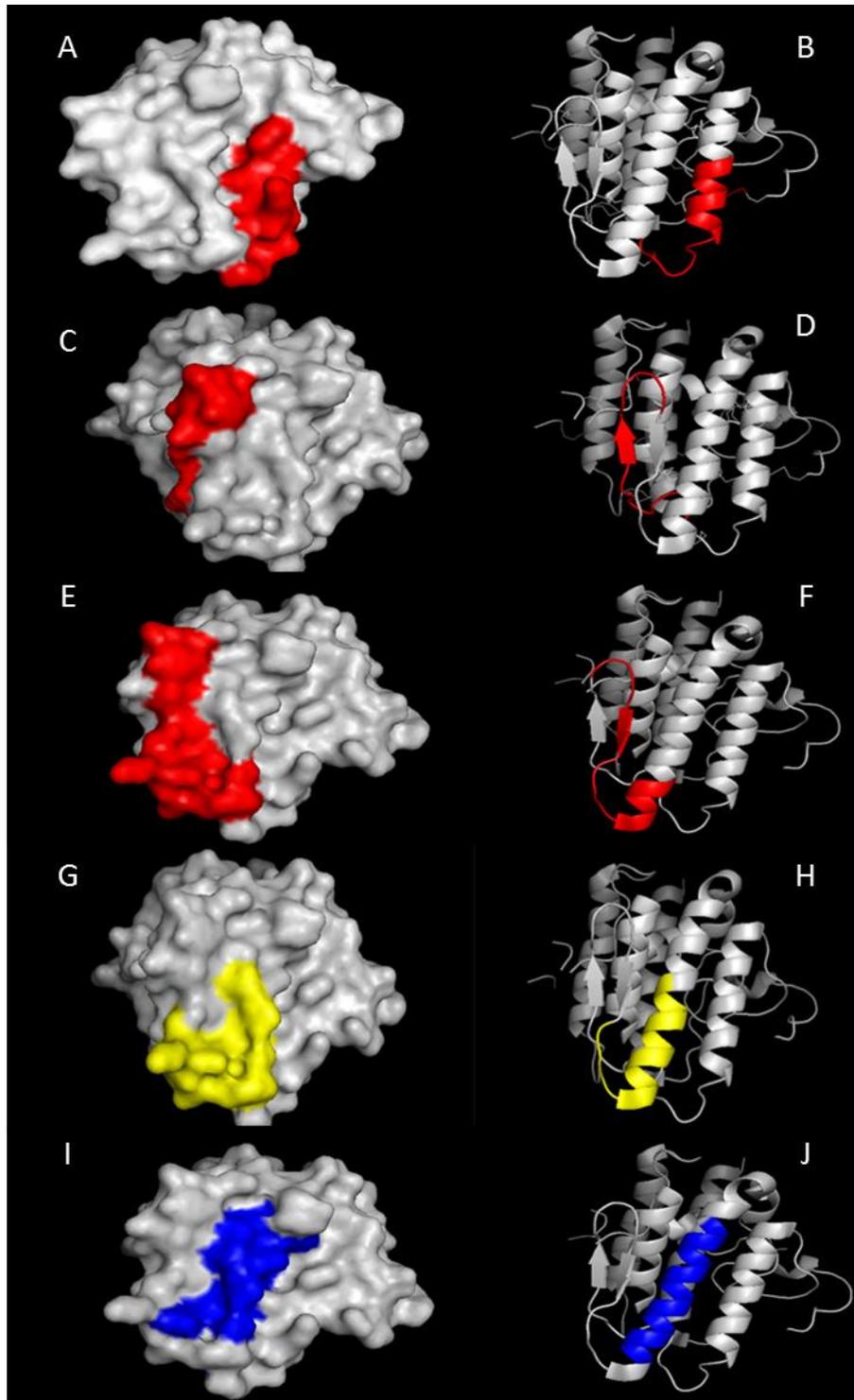


Figura 15. Visualização da estrutura 3D da crotoxina, em duas configurações diferentes. As seqüências dos spots imunogênicos da subunidade básica (regiões coloridas) são mostradas na estrutura 3D, A e B spot número 16, em vermelho, C e D spot número 20 em vermelho, E e F spot número 24 em vermelho, G e H spot número 26 em amarelo e I e J spot número 28 em azul.

5.4 Modelagem por homologia da Ctx, (subunidade ácida)

Para a modelagem do CTx foi utilizado o programa SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org>). A proteína que foi usada como molde para criar o modelo foi a Fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Agkistrodon halys pallas* (PDB 1M8S, cadeia A). Esta proteína tem a maior similaridade (65,6%) com a fosfolipase ácida de *Crotalus*, o modelo criado é mostrado na Figura 16A, é possível observar a configuração de superfície, e a região que representa os aminoácidos que correspondem ao peptídeo 13, em verde. A Figura 16B mostra a estrutura em sua configuração de alfa hélices e folhas beta.

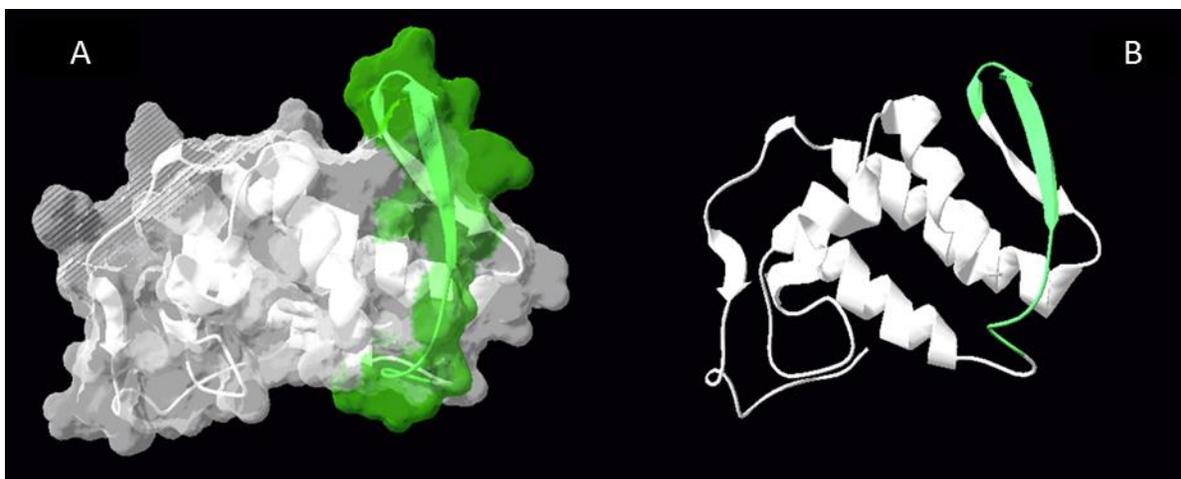


Figura 16. Representação estrutural no modelo 3D do sequência de aminoácidos do peptídeo 13 da subunidade ácida da crotoxina. Essa região corresponde com à sequência do peptídeo DPTTDVYTYRQEDGE. (A) (B)

O alinhamento entre a subunidade ácida da crotoxina e a fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Agkistrodon* foi realizado. É possível observar a grande similaridade entre as moléculas. Em azul destaca-se a região da proteína onde está localizada a sequência de aminoácidos que corresponde ao spot 13 da CA. Esta região é formada, por uma folha beta e um *Loop* β - β , mostrado na Figura 17A. E na Figura 17B pode-se observar o alinhamento entre a subunidade básica da crotoxina e a fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Agkistrodon*. É importante ressaltar que ambas proteínas tem uma grande semelhança estrutural, mostrando que o peptídeo modelado pode ser alinhado com ambas

subunidades da crotixona porque elas tem uma grande semelhança ou similaridade estrutural.



Figura 17. Sobreposição da subunidade básica da crotixona de *Crotalus durissus terrificus* e subunidade ácida da Fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Agkistrodon halys pallas*, (A), em azul região que corresponde ao spot 13 da (CA). Sobreposição da subunidade ácida da crotixona de *Crotalus durissus terrificus* e subunidade ácida da Fosfolipase A₂ ácida do veneno de *Agkistrodon halys pallas*, (B) em azul é mostrada a localização da região que corresponde ao spot 13,

Para conferir a qualidade do modelo, foi feita a análise da qualidade do modelo empregando a ferramenta o QMEA disponível em <https://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi> Além dessa ferramenta analisar o modelo, ela produz score confiável, que pode ser utilizado para comparar e classificar qualitativamente os modelos experimentais e computacionais. A estimativa de qualidade varia entre 0 e 1, com valores mais elevados para os melhores modelos. Sendo assim, os scores obtidos pelo QMEAN suportam a hipótese de que o modelo construído é confiável.

O resultado da análise da qualidade estrutural demonstrou que o modelo proposto neste trabalho para o peptídeo é confiável e representativo mostrado na Figura 18, onde se mostra os valores Qmean para as proteínas cristalizadas disponível em PDB, e na estrela vermelha mostra o score do modelo feito, achando que este esta localizado na regiões perto do valor de 1 junto com a maioria do valores Qmean ortorgados para as proteínas empregadas da base de dados.

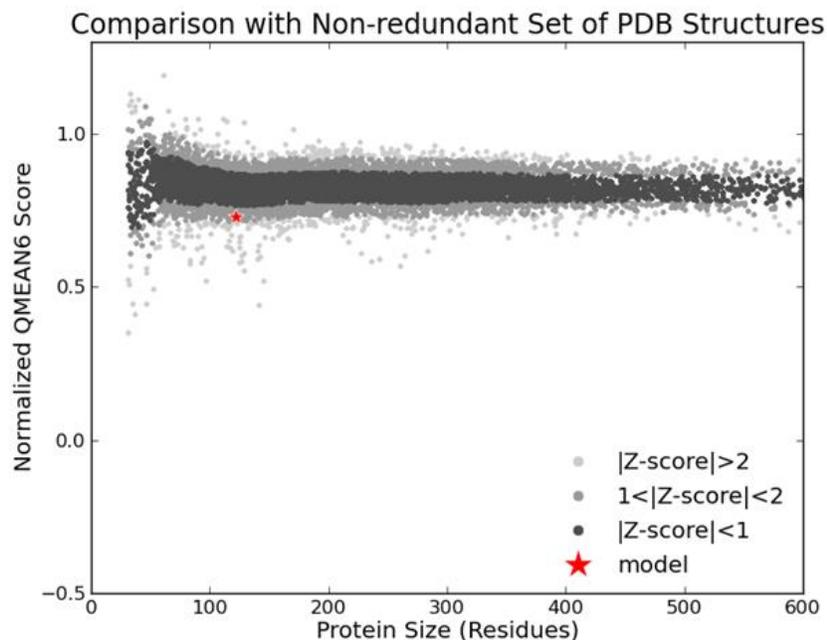


Figura 18. Análise da qualidade e confiabilidade do modelo da estrutura da proteína modelada. Vital na predição de estrutura de proteínas. Analizada com Qmean serve.

Tabela 8. Desafio em camundongos imunizados com implantes de discos cortados da membrana de spot. Os animais que reagiram positivamente em testes de ELISA frente ao veneno na semana 16 (dados não mostrados) foram seleccionados para o ensaio, testando neles o equivalente a 2 µg de veneno/ 20 gramas de camundongo.

Grupo	N° SPOT	Dose de veneno	Reação em Elisa	Sobreviventes
Subunidade ácida (P08878)	13	8 µg	0.18	-
	17		0.36	-
	23		0.19	-
	26		0.55	-
Subunidade básica (P0CAS6)	16		0.6	-
	20		0.5	-
	24		0.3	-
	26		0.4	+
	28	0.4	-	

O resultado do desafio mostra que só um camundongo sobreviveu, indicando que o soro produzido pela imunização com o implante do spot número 26 logro neutralizar a dose de veneno aplicada, sendo um indicio que efetivamente se pode produzir anticorpos neutralizantes pela imunização de pequenos fragmentos de proteínas (peptídeo), este ensaio serão feito com um maior número de animais para ter um N mais representativo, abordado nos trabalhos futuros deste projeto.

5.5 Síntese química dos epitopos selecionados pelos diferentes métodos de imunização aplicados

Foram selecionadas 6 sequências de aminoácidos para ser sintetizadas duas delas corresponde aos spot positivos identificados pelos método de membrana de spot e 2 pelo método de imunização com implantes subcutâneos com Spot, (aquela sequência que teve uma maior reatividade pelo ensaio de ELISA para a semana 8, uma por cada subunidade CA e CB), a sequência 26 da subunidade básica, seleccionada pelos ensaio de desafio em camundongos Por último uma sequência não reativa para cada uns dos ensaios testado foi, usada como controle negativo, todas elas mostrada na Tabela 9.

Tabela 9. Sequência de aminoácidos dos peptídeos seleccionados por diferentes métodos e sintetizados quimicamente

Peptídeo	Sequência	Método de seleção	Sub-unidade da crotoxina		Massa teorica
P1	YKYLQFSPENCQGESQPC	Spot	CA	C-ter	2090
P2	ECDKAAAICFRNSMDT	Imunização	CA	Spot 23	1175
P3	YKNGYMFYDSCRGRGPSETC	Spot	CB	C-ter	2340
P4	VHDCCYEKVTTCNTK	Imunização	CB	Spot 16	1720
P5	GKGTWCKEQICECDR	Imunização	CB	Spot 26	1710
P6	KMIKFETRKNVVPFY	Controle negativo	CB	Spot 3	1872

Feita a seleção dos peptídeos, foi realizada a síntese química de peptídeos solúveis pelo método Fmoc (Merrifield, 1969), para sua posterior utilização como imunógenos.

O peptídeo número 6, foi um peptídeo não reativo para o método de spot como também para o método de implantes subcutâneo, sendo utilizado como controle negativo. As massas dos peptídeos foram calculadas usando as ferramentas do site

<http://pepcalc.com/> As Figuras 19 a 24, mostram os perfis do análise de massa dos peptídeos após a clivagem da resina.

Os peptídeos 1, 2, 5 e 6 mostraram um espectro de massa que corresponde com a massa esperada, enquanto o peptídeo 3 mostra uma diferença positiva de 233Da, que pode ser dada pelos grupos Fmoc e algum grupo protetor da cadeia lateral dos aminoácidos.

O peptídeo 4 tem uma diferença negativa de 102 Da, considerando as massas dos resíduos de aminoácidos, aqueles que mais se aproximam de 102 Da, são cisteína e treonina, pelo qual uns destes aminoácidos falta no peptideo sintetizado.

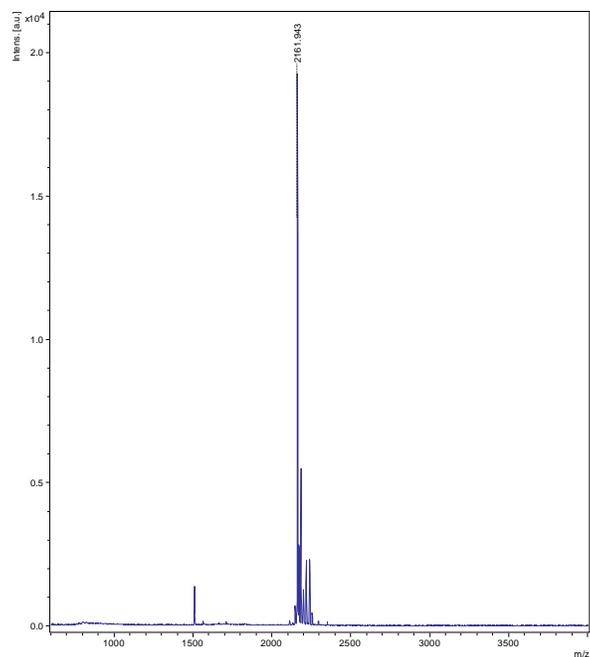


Figura 19. Perfil de análise por espectrometria de massas do peptídeo 1 (YKYLQFSPENCQGESQPC). Foi obtido um pico maior que 2161 daltons, que corresponde perfeitamente com a massa teórica calculada para o peptídeo 2162 daltons.

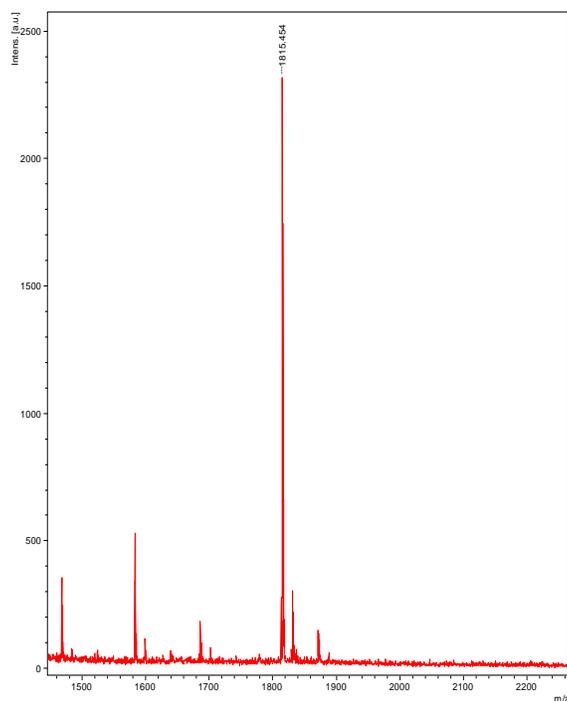


Figura 20. Perfil de análise por espectrometria de massas do peptídeo 2 (ECDKAAAICFRNSMDT). Foi obtido um pico maior que 1815 daltons, que corresponde perfeitamente com a massa teórica calculada para o peptídeo 1815 daltons.

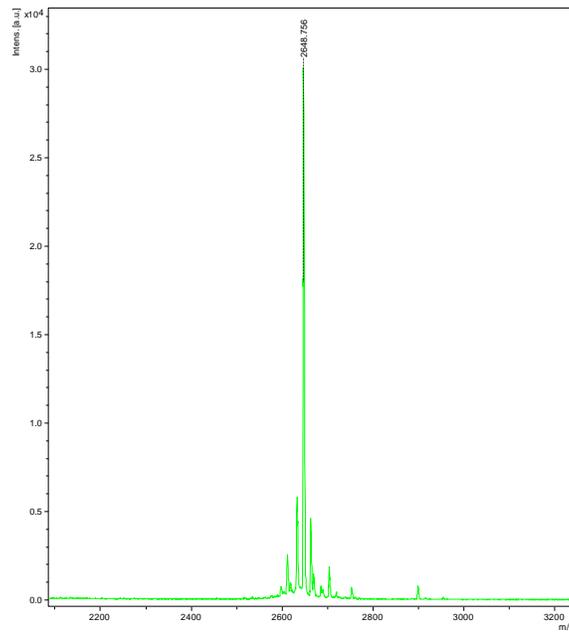


Figura 21. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 3 (YNGGYMFPDSRCRGPSETC). Foi obtido um pico maior de 2648 daltons, so um pouco maior que a massa teorica calculada para o petídeo que foi de 2415 daltons.

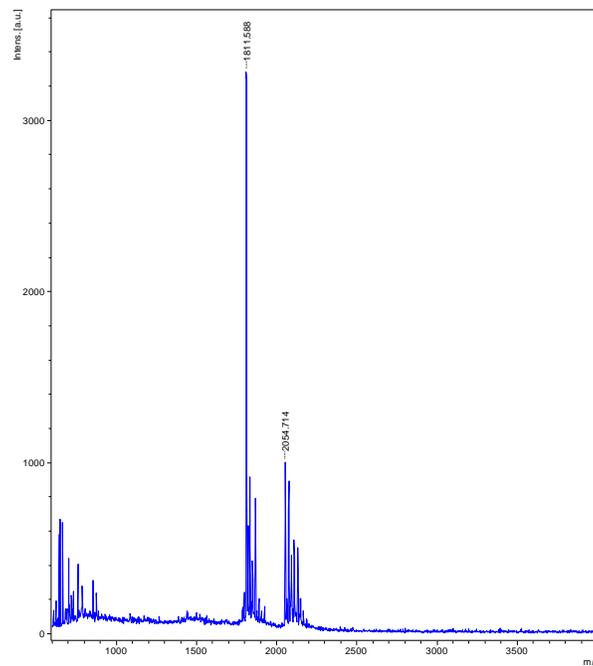


Figura 22. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 4 (VHDCCYEKVTCKNTK). mostrando um pico maior de 1811 daltons, so um pouco menor que a massa teorica calculada para o petídeo que foi de 1913 daltons.

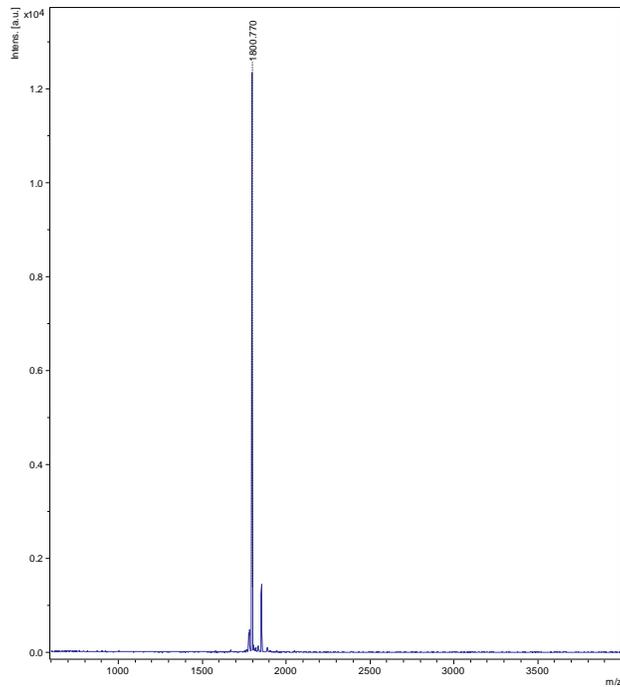


Figura 23. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 5 (GKGTWCKEQICECDR). Foi obtido um pico maior de 1800 daltons, que corresponde com a massa teorica calculada para o peptídeo que foi de 1797 daltons.

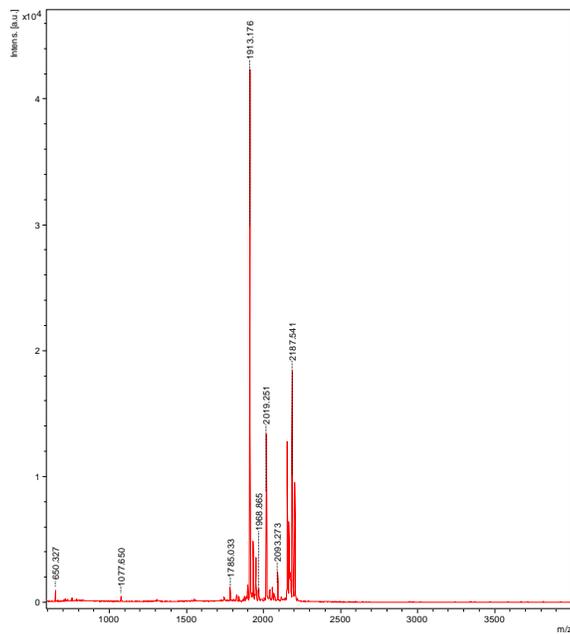


Figura 24. Perfil da análise por espectrometria de massas do peptídeo 6 (KMIKFETRKNVFPFY). Foi obtido o um pico maior de 1913 daltons, que corresponde com a massa teorica calculada para o peptídeo que foi de 1913 daltons.

5.6 Caracterização antigênica dos peptídeos sintetizados

Para conferir se os peptídeos sintetizados eram reconhecidos pelos anticorpos do soro anticrotálico se realizou-se um ensaio de Dot Blot. O soro utilizado para o ensaio foi o soro anti-crotálico de cavalo cedido pela Fundação Ezequiel Dias.

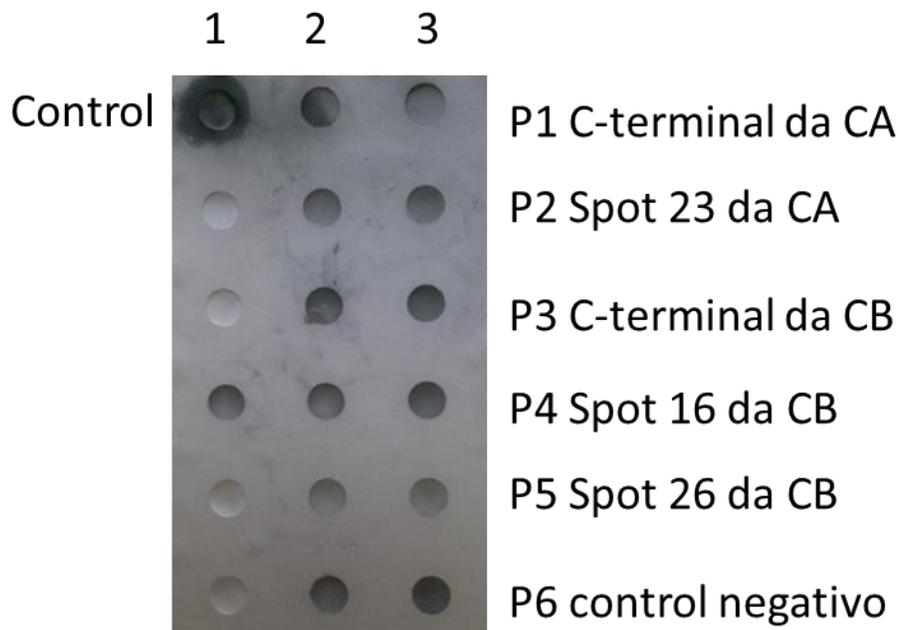


Figura 25. Dot Blot dos peptídeos da crotixina, 25 µg de peptídeo por poço. Como controle positivo foi empregado veneno total de *Crotalus durissus terrificus*., Nas fileiras 2 e 3 estão os peptídeos avaliados na ordem que se mostra na Figura, e a sequências dos peptídeos está mostrada na Tabela 9.

Na Figura 25, pode observar-se as diferenças da reatividade do soro com os diferentes peptídeos, o primeiro ponto da fileira 1 corresponde ao controle positivo, (veneno crotálico) e, nas fileiras 2 e 3 pode-se observar a reatividade dos peptídeos, de P1 até P6. Apesar de todos os peptídeos terem sido reativos, foi observada maior reatividade dos peptídeos P3, 4 e 6.

5.7 Caracterização imunogênica dos anticorpos

Outro ensaio de Dot Blot foi realizado para conferir a reatividade dos soros produzidos com a imunização com os peptídeos. Esse ensaio, consistiu em um teste do soro frente ao

veneno crotálico e frente aos peptídeos se compara a reatividade dos soros produzidos (Figura 26).

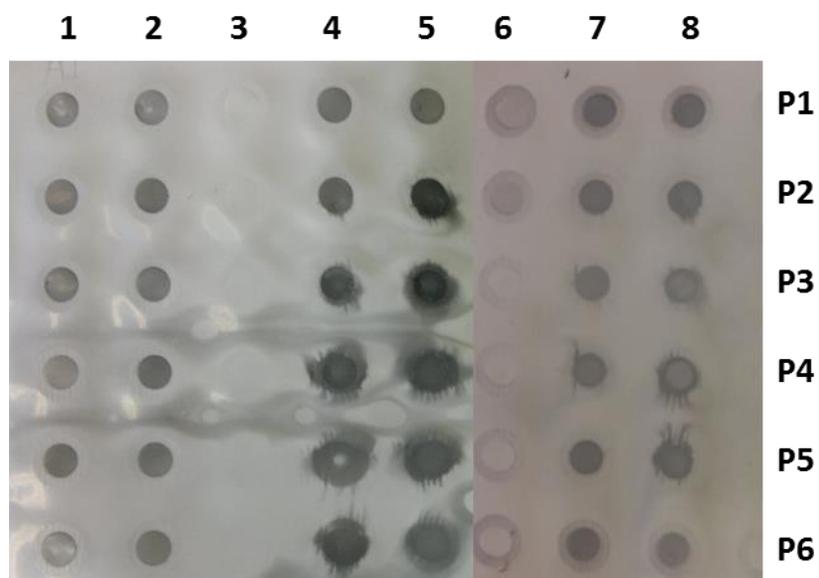


Figura 26. Dot Blot da avaliação dos soros produzidos. Fila 1 e 2 soros anti-peptídeos testados contra o veneno crotálico. Fila 4 e 5, soros anti-peptídeos testado contra os peptídeos. Fila 7 e 8 soro anti-peptídeos testado contra crotoxina.

Na figura 26, observa-se, que os soros anti-peptídeos reconhecem o veneno crotálico ea crotoxina, não com a mesma intensidade que os peptídeos, mas é considerado como positiva a reação, em comparação com a fileira 3, que não contém nada na qual não houve reatividade.

6. Discussão

O veneno produzido por serpentes é uma complexa mistura de componentes tóxicos e não-tóxicos que possuem variados efeitos fisiológicos em tecidos excitáveis, sistema cardiovascular, permeabilidade vascular, função renal e homeostase (Estevão-costa, et al., 2000). Como foi descrito, o envenenamento por *Crotalus durissus terrificus*, leva ao desenvolvimento de paralisia muscular e insuficiência renal aguda.

A crotoxina é encontrada em alta concentração no veneno e, esta tem um papel muito importante no efeito tóxico do veneno em vítimas de acidentes com serpentes do gênero crotálico na América do Sul.

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

A crotoxina, é uma proteína polipeptídica com um componente básico e outro ácido de 14 e 9 kDa respectivamente com efeitos neurotóxicos, (Beghini et al., 2000), presentes em todos os venenos das serpentes do gênero *Crotalus* de sul-américa, que atua no sistema nervoso central, causando efeitos convulsivos crônicos e outros efeitos citotóxicos (Lomeo et al., 2014). Devido a isso, a inibição da crotoxina do veneno de serpentes é importante para o prognóstico em vítimas acidentadas.

Com a perspectiva de induzir anticorpos específicos contra os epítopos da crotoxina, e possível neutralização do efeito desta toxina através da imunização com peptídeos sintéticos previamente selecionados, optou-se por testar três métodos de mapeamento de epítopos lineares, o primeiro usando ferramentas bioinformáticas para prever epítopos, segundo o método de SPOT e o terceiro imunização com spot.

Com o intuito de aprofundar sobre a propriedade imunogênica da crotoxina, epítomos lineares desta proteína foram preditos utilizando métodos específicos para linfócitos B, EIDB emini, análise de acessibilidade e ABCpred (Saha and Raghava, 2006).

Estudos cristalográficos têm demonstrado que a maioria dos epítomos de antígenos protéico são descontínuos (Haste Andersen et al., 2006). Entretanto, devido a dificuldade na produção e validação, existem poucos programas de bioinformática desenvolvidos para predição de epítomos descontínuos, sendo a maioria dos programas existentes voltados para identificar apenas epítomos contínuos devido a que são menos complexos que os epítomos descontínuos (Sun et al., 2009).

Para a subunidade ácida da crotoxina foram preditos pelo programa ABCpred 11 epítomos e 2 pelo programa EIDB, que coincidem com os preditos pelo programa ABCpred. Do mesmo jeito foram preditos para a subunidade Básica 11 epítomos com o programa ABCpred e 4 com o EIDB. Em ambas subunidades a região C-terminal da proteína foi identificada como possível epítomo linear., A análise das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal de cada uma, mostram que contem aminoácidos carregados que são importantes nas interações com anticorpos. Esses resultados indicam que as predições podem ser mais fidedignas quando os resultados de diferentes predições são usadas de forma combinada na identificação de epítomos, deste jeito é selecionada as regiões mais consistente.

A técnica de SPOT consiste na síntese de múltiplos peptídeos lineares sobrepostos, os quais cobrem toda sequência primária da proteína. Estes peptídeos estão fixos em um suporte sólido, neste caso, uma membrana de celulose. A membrana contendo os peptídeos da crotoxina foi usada em ensaios de imunoafinidade e de localização de regiões imunodominantes.

O mapeamento em membrana de celulose, usando-se soro de cavalo anticrotalico, apresentou uma região principal bastante imunogênica: a região C-terminal em ambas subunidades que conformam a crotoxina. Uma das características observadas nas sequências peptídicas das regiões imunogênicas selecionadas foi a presença de resíduos de aminoácidos carregados, tanto positivamente como negativamente. Machado de Ávila,

et al., 2004, em um trabalho de mapeamento de epitopos, descreveu que estes resíduos são críticos para a ligação entre antígeno com o anticorpo e que alterações destes resíduos em proteínas homólogas resultam em perda de afinidade.

Verificando as sequências peptídicas da região C-terminal da CA (YKYLQFSPENCQGESP) e da CB (YKNGYMFYPD^SRCRGPSE^ETC), os aminoácidos carregados identificados nestas sequências em cor amarelo, são conservados nas outras isoformas da crotoxina reportadas que são formadas pela interação de uma subunidade ácida mais uma subunidade básica, se tem reportado 4 subunidades ácidas e 4 subunidades básicas, deste jeito se pode ter 16 diferentes isoformas da crotoxina (Faure et al., 2011).

Nosso modelo de mapeamento com implante subcutâneo é um modelo simples, que é aplicável para a produção de anticorpos policlonais ou monoclonais em diferentes hospedeiros. Além disso, não requer adjuvantes tradicionais, o que reduz a resposta imune severas e desconforto associadas aos animais (Coghlan e Hanausek., 1990).

A entrega dos antígenos pelo spot deve ser lenta, indicando que provavelmente os antígenos estão presente no sitio de implantação mesmo depois de 8 semanas, como se pode observar nos gráficos 3 e 4, onde depois de 8 semana se tem o maior pico de produção de anticorpos contra os antígenos presente no spot. Este resultado é muito atraente já que o método pode representar uma alternativa para fixar antígenos no lugar específico, com a redução dos efeitos tóxicos dos processos de imunização.

Este método de mapeamento produziu resultados diferentes da predição com métodos bioinformáticos e do mapeamento com membrana de SPOT, mostrando outras regiões da crotoxina que são imunoreativas, pelo qual se selecionaram as sequências dos SPOT implantando que deram uma reatividade superior a 0,4 no ensaio de ELISA do segundo mês após a imunização, assim selecionamos só as melhores sequências para sintetizar, que mostram na tabela 9.

Após 16 semanas da implantação dos spot nos camundongos, foi feito um desafio com veneno total crotálico nos camundongo que apresentaram uma maior reatividade frente

ao veneno no ensaio de ELISA mostrado nas figuras 12 e 13, as sequências dos spot que cotelos os animais seleccionados se mostra na tabela 6 e 7., Após o desafio o camundongo que contem o spot numero 26 sobrevivio a uma doses de 8 µg de veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, o que nós indica que esta sequênciã do spot é um alvo importante para produzir anticorpos que podem ser neutralizantes, mas é necesario repetir o ensaio com um número maior de animais para ter um resultado mais confiável

Todas as sequências seleccionadas foram localizadas na estrutura 3D da crotoxina com a finalidade de conhecer que tipo de configuração esta formando e se estão exposta na superficie da proteína., Como se observam na figuras 14, 15 e 16, todas estas sequências estão formando diferentes configurações entre α -helices, folhas β e loop.

A localização dos peptídeos escolhidos representantes das regiões epitópicas localizadas nas estruturas 3D demonstrou que todos eles de fato encontram-se expostos na superfície da molécula portanto, acessíveis à ligação de anticorpos., Fazendo uma análise da composição de aminoácidos que conformam as sequências seleccionadas na tabela 9, mostra a presença em todas elas de aminoácidos hidrofobicos. (Koloskar e Tongaonkar, 1990), em seu trabalho descrevem que aminoácidos hidrofóbicos quando estão na superficie da proteína são susceptíveis de ser uma parte de determinantes antigênicos, e todas a sequências seleccionadas tem aminoácidos hidrofobicos e carregados.

Baseando-se nestas observações, as sequências peptídicas da região C-terminal pertencentes a cada uma das subunidades CA e CB, juntos com as sequências que levam a produção de anticorpos mais reativos frente ao veneno total de Cdt seleccionadas pelo mapeamento com implantes subcutaneos foram seleccionadas para a síntese química. Após a síntese química, os peptídeos foram analisados por espectrometria de massa.

Os peptídeos foram submetidos a ensaios de Dot Blot com o soro de cavalo anticrotalico para confirmação da atividade antigênica, antes disso os peptídeos foram polimerizados com glutaraldeído, necesario porquê o pequeno tamanho dos peptídeos em relação aos anticorpos, e sua dificuldade de se ligar a placas de ELISA, aumenta a dificultad de ser reconhecidos pelo anticorpo, de ai que se decidiu fazer o ensaio de Dot Blot, devido a

facilidade que tem a nitrocelulose para reter proteínas, neste caso vai ser peptídeos. O resultado da atividade peptídeo / anticorpo confirma os dados dos imunoenaios em membrana.

Uma vez atestada a pureza e qualidade dos peptídeos sintetizados, camundongos swiss foram utilizados para imunização visando a produção de anticorpos anti-peptídeo. Os peptídeos foram polimerizados com glutaraldeído e emulsificados em adjuvante completo de Freund, um dos mais utilizados em pesquisa. Para primeira dose, utilizou-se adjuvante completo, e nas cinco doses posteriores, adjuvante incompleto. A utilização do adjuvante baseou-se na intenção da liberação contínua de antígenos para o estímulo da resposta imune, como descrito pelo fabricante.

Van Regenmortel (2001), esclarece que peptídeos sintéticos são pouco imunogênicos quando são utilizados em imunizações. Esta baixa imunogenicidade é devida a baixa massa molecular e por suas sequências estarem simplificadas no contexto molecular, fazendo-se necessário o uso de carreadores ou melhoramentos na arquitetura da síntese com o intuito de melhorar e aumentar a apresentação destes peptídeos ao sistema imunológico. Com a finalidade de produzir anticorpos anti-peptídeos, estes epitopos sintéticos foram polimerizados com glutaraldeído.

Após o ciclo de imunizações com os peptídeos polimerizados, o soro de camundongo anti-peptídeo foi submetido a ensaios de Dot Blot para análise da reatividade frente ao veneno total de crotalico e ao mesmo peptídeo. Constatou-se que os soros dos animais que foram imunizados com peptídeos sintéticos mostrou ser capaz de reconhecer o veneno crotalico e o peptídeo, apresentando uma boa reatividade.

O presente trabalho conseguiu atingir os objetivos propostos e pode ser base para estudos futuros que possam contribuir para a produção de soro anticrotalico. O veneno crotalico é pouco imunogenico, a baixa imunoreatividade dos soros anticrotalicos produzidos no instituto Vital Brasil (Niterói, Rio de Janeiro, Brasil) e no Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), faz necesario implementar novas metodologias que aumente e facilitem a produção de soros. Partindo disso a importância de trabalhar com peptídeos sintéticos

representativos das principais toxinas presentes nos venenos de serpentes, neste trabalho orientado ao estudo com peptídeos da crotoxina presente no veneno crotalico Calvete et al, (2010).

A hiperimunização de cavalos com toxinas para a produção de anticorpos com capacidade neutralizante é uma técnica realizada a mais de 100 anos. A escolha dos antígenos é um fator primordial para a produção da neutralização das principais toxinas responsáveis pelo envenenamento (Butantan, 2013). É fundamental a constante busca de novas técnicas que visam aprimorar essa produção e atender a demanda nacional, que no caso de soros antiofídico, muitas vezes encontra-se defasada. A estratégia de imunização de animais através da síntese de peptídeos sintéticos representativos das principais toxinas pode ser mais um avanço na busca de produtos ativos

7. Conclusão

- A técnica de predição de epítomos, SPOT síntese e de mapeamento por implantes subcutâneos foram eficientes para o mapeamento dos determinantes antigênicos da crotoxina, principalmente pela associação desses resultados.
- Os peptídeos selecionados e sintetizados foram reconhecidos pelo soro de cavalo anticrotoxina, mostrando que estas técnicas podem ser úteis na identificação de antígenos específicos para a produção de antisoros.
- O uso de peptídeos foram capazes de induzir anticorpos que reconhecem os peptídeos, crotoxina e o veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

8. Trabalhos futuros

1. Avaliar o potencial de neutralização dos anticorpos produzidos por imunização com peptídeos.
2. Fracionar o soro de coelhos para a obtenção da fração IgG do soro anti-peptídeos para utilização em ensaio de inibição da crotoxina.
3. Realizar testes de inibição de outros venenos de serpente do género *Crotalus* sul-americana utilizando estes anticorpos anti-peptídeos.
4. Determinar os aminoácidos importantes para a ligação peptídeo-anticorpo por meio da técnica de ALA-Scan.

9. Referências Bibliográficas

Akram, A. and Inman, R. D. 2012. Immunodominance: A pivotal principle in host response to viral infections. *Clinical Immunology* 143(2), 99–115.

Amit, A. G., Boulot, G., Comarmond, M. B., Harper, M., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E., Saludjian, P., Saul, F. A., Souchon, H. and Tougard, P. 1985. X-ray diffraction studies of an anti-azophenylarsonate antibody and of an antigen-antibody complex. *Ann. Inst. Pasteur Immunol* 136(1), 121-129.

Barrabin, H., Martiarena, J. L., Vidal, J. C., Barrio, A. 1978. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosemberg, P. *Toxins: Animals, Plant and Microbial*. New York, Pergamon press, p. 113-133.

Barrio, A. and Vital Brazil. 1951. Neuro muscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* (Laur.) poisons. *Acta Physiol. Latinoamericana*, 1, 291-308.

Benkert, P., Tosatto, S.C.E. and Schomburg, D. 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins* (71)1, 261-277.

Beghini, D. G., Toyama, M. H., Hyslop, S., Sodek, L., Novello, J. C. and Maragoni, S. 2000. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. *J. protein Chem.* 19, 603-607.

Beghini, D. G., Cruz-Hofling, M. A., Randazzo-Moura, P., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J. C., Hyslop, S., Maragoni, S. 2005. Cross neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 46, 604–611.

Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D., Jain, M. K. 2001. "Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm". *Chemical Reviews* 101 (9), 2613–54.

Boldrini-frança, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M. S., Rodrigues, R. S., Pilar de la Torre., Pérez, A., Soares, M. A., Zingali, R. B., Nogueira, R. A., Nogueira, R. A., Rodrigues, M. V., Sanz, L., Calvete, J. J. 2010. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from

Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics*. 73, 1758-1776.

Bon, C., Bouchier, C., Choumet, V., Faure, G., Jiang, M.S., Lambezat, M.P., Radvanyi, F., Saliou, B. 1989. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam*. 39, 439-448.

Calvete, J.J., Sanz, L., Cid, P., De la Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, C. M., Borges, A., Bremo, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutierrez, J. M. 2010. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive Paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome research*. 9, 528-544.

Chang CC, Lee CY. 1963. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 144, 241-257.

Cardi, B.A., Nascimento, N., Rogero, J.R., Andrade Junior, H.F. 1992. Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in the motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 25, 905–908.

Chang, C.C., Lee, J.D. 1977. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venoms, is a pre-synaptic toxin acting like b-bungarotoxin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 296, 159–168.

Cheymol, J., Goncalves, J. M., Bourillet, F. et al. 1969. Effects neuromusculaires des venins deux varietes de *Crotalus durissus terrificus*. *Archs. mIn. Pharmacodyn*. 179, 40-55.

Cheymol, J., Goncalves, J. M., Bourillet, F. et al. 1971a. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var *crotaminus*./I./ Sur préparations neuromusculaire in situ. *Toxicon*. 9, 279-286.

Cheymol, J., Goncalves, J. M., Bourillet, F. et al. 1971b. Action neuromusculaire comparée de a crotamine et du venin de *Crotalus durissus errificus* var *crotaminus*./II./ Sur préparations isolées. *Toxicon*. 9, 287-289.

Coghlan, L. G and Hanausek. M. 1990. Subcutaneous immunization of rabbits with nitrocellulose paper strips impregnated with microgram quantities of protein. *Journal of Immunologica Methods*. 129, 135-138.

Correa, C.R., Bertollo, C.M., Goes, A.M. 2009. Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncol Res*. 17, 473–482.

Duarte, C.G., Alvarenga, L.M., Dias-Lopes, C., Machado-de-Avila, R.A., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C. 2010. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine*. 28, 1168-1176.

Dumanli, A. G. 2016. Nanocellulose and its composites for Biomedical Applications. *Current Medicinal Chemistry*. 23.

Emini, E. A., Hughes, J. V.; Perlow, D. S. & Boger, J. 1985. Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus- specific synthetic peptide. *Journal of Virology*, 55(3), 836–839.

Estevão-Costa, M. I., Diniz, C. R., Magalhaes, A., Markland, F. S., Sanchez, E. F. 2000. Action of metalloproteinases Mutalysin I and II on several components of the hemostatic and Fibrinolytic Systems. *Thrombosis Research* 99, 363-376.

Faure, G., Harvey, A. L., Thomson, E., Saliou, B., Radvanyi, F., Bom, C. 1993. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action *Eur. J. Biochem*. 214, 491–496

Faure, G., Xu, H., Saul, F. 2011. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. *Journal of Molecular Biology*. 412, 176-191.

Ferrira, R. 2005. MAPEAMENTO E SÍNTESE DE EPITOPOS DA MUTALISINA II (LHF-II) METALOPROTEINASE PURIFICADA DO VENENO DE *Lachesis muta muta*. (Teses de mestrado). Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil.

Frank, R. 1992. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48(42), 9217–9232.

Frank, R. 2002. The spot-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports principles and applications. *Journal of Immunological Methods*. 267, 13– 26.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA 2001. Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ed. COMED/ASPLAN/FNS.

Fusco, L. S., Rodríguez, J. P., Teibler, P., Murañak, S., Acosta, O., Leiva, L. 2015. New protocol to produce antivenom combining *Crotalus durissus terrificus* venom ant its PLA₂. *Biologicals*. 43, 62-70.

García, M., Monge, M., León, G., Lizano, S., Segura, E., Solano, Gutiérrez, J. M. 2002. Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in Snakebite Envenomation. *Biologicals*, 30, 143-151.

Gershoni, J.; Roitburd-Berman, A.; Siman-Tov, D.; Freund, N. T. & Weiss, Y. 2007. Epitope mapping: The first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs*, 21(3), 145–156.

Geysen, H.M., Mason, T.J., Rodda, S.J. 1988. Cognitive features of continuous antigenic determinants. *J. Mol. Recognit.* 1(1), 32-41.

Gonçalves, J. M and Polson, A. 1947. The electrophoretic analysis of snake venoms. *Arch. Biochem.* 13, 253-259.

Gonçalves, J. M and Vieira, L. G. 1950. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. / I./ Análise eletroforética. *An. Acad. Bras. Cienc.* 22, 141-149.

Harrison RA, Cook DA, Renjifo C, Casewell NR, Currier R. B. 2011. Research strategies to improve snakebite treatment: Challenges and progress. *Journal of Proteomics* 74, 1768-1780.

Haste Andersen, P., Nielsen, M., Lund, O. 2006. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci.* (11), 2558-67.

Hawgood, B.J., Bon, C. 1991. Snake venom presynaptic toxins. In: Tu, A.T. (Ed.), Handbook of Natural Toxins: Reptile Venoms and Toxins. Marcel Dekker, New York, pp. 3–52.

Hawgood, B.J., Smith, J.W. 1977. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A2-crotapotin complex isolated from the venom of the South American rattlesnake. *Br. J. Pharmacol.* 61, 597–606.

Instituto Butantan, 2006. Serie Didática Número 5. São Paulo

Jackson, D. C.; Chua, B. Y. & Zeng, W. 2006. Totally synthetic peptide-based vaccines that target dendritic cells and induce potent antibody or ctl responses. *International Congress Series*, 1289, 311–315.

Jien, C., Tetrault, A. 2008. Comparison of standard and new generation hydrophobic interaction chromatography resins in the monoclonal antibody purification process. *Journal of chromatography*. 1177, 272-281.

Karplus, P. & Schulz, G. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*. 72, 212–213.

Kolaskar, A. S and Tongaokar, P. C. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinantson protein antigens. *FEBS*. 276, 172-174

KRICKA, L.J. 1999. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry*. 45(7), 942-956

Kruse, H., Van Wimersma, G. T., Wieda, D. 1977. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 7, 311-313.

Lathuilière, A., Laversenne, V., Astolfo, A., Kopetzki, E., Jacobsen, H., Stampanoni, M., Bohrmann, B., Schneider, B. L., Aebischer, P. 2016. A subcutaneous cellular implant for passive immunization against amyloid- β reduces brain amyloid and tau pathologies. *A Journal of Neurology*. 139(5), 1587-164.

Laune, D., Molina, F., Ferrières, G., Villard, S., Bès, C., Rieunier, F., Chardès, T. and Granier, C. 2002. Application of the spot method to the identification of peptides and amino acids

from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*, 267, 53–70.

LillyWhite, B. H. 2014. *How Snake Work: Structure, Function and Behavior of the World's Snake*. Oxford New York: OUP USA.

Lima, S. L., Machado. C. B., Pereira. M. A. C., Cara. D. C., Velarde. D. T., Andrade. S. P and Gontijo. C. M. 1999. Immunization by subcutaneous implants of polyester-polyurethane sponges couples with antigen. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32, 443-447.

Lomeo, R., Gonçalves, A. P., Nunes da Silva, C., Tunes de Paula, A., Costa Santos, D. O., Fortes-Dias, C.L., Gomes, D. A., de Lima M. E. 2014. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon* 85, 5-16.

Loureço, Airton Jr., Zorzella, C. F.C., Curtolo de Barros, L., Delazari dos Santos, L., Pimenta, D., Barraviera, B., Ferreira, R. S. 2013. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotoamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. *Toxicon* 69, 75-81.

Machado de Avila, R. A.; Alvarenga, L. M.; Tavares, C. A. P.; Molina, F.; Granier, C. & Chávez Olórtegui, C. 2004. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, 44(3), 233–241.

Machado de Avila, R. A.; Stransky, S.; Velloso, M.; Castanheira, P.; Schneider, F. S.; Kalapothakis, E.; Sanchez, E. F.; C. Nguyen F. Molina and, C. G. & Chávez Olórtegui, C. 2011. Mimotopes of mutalysin-II from *lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. *Peptides*, 32, 1640– 1646.

Marchi-Salvador, D. P., Correa, L. C., Magro, A. J., Oliveira, C. Z., Soares, A. M., Fontes M. R. M. 2008. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin:

crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins*. 72, 883-891.

Mackessy, Stephen, P. 2010. The Field of Reptile Toxinology: Snakes, Lizards and Their Venoms. *Handbook of Venoms and Toxins*. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, Chap. 1, p. 3-24.

Malasit, P., Warrel, D. A., Chanthavaanich, P., Viravan, C., Mongkolsapaya, J., Singthong, B and Supich, C. 1986. Prediction, prevention, and mechanism of early (Anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. *British Medical Journal*, 292, 17-20.

Méndez, I., Gutiérrez, J.M., Angulo, Y. 2011. Comparative study of the cytolytic activity of snake venoms from African spitting cobras (*Naja* spp., Elapidae) and its neutralization by a polyspecific antivenom. *Toxicon*. 85, 558–564.

Moio da Cunha, E., Martins, O. A. 2012. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos generos *Bothrops* e *Crotalus* uma revisão. *Revista Electronica de Educação e Ciências*, 2, 21-26.

Moran, N. F., Newman, W. J., Theakston, R. D., Warrell, D. A., Wilkinson, D. 1998. High Incidence of Early Anaphylactoid Reaction to SAIMR Polyvalent Snake Antivenom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 92, 69-70

Muniz, Z.M., Diniz, C.R. 1989. The effect of crotoxin on the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the guinea pig ileum. *Neuropharmacology*. 28, 741–747.

Ownby, C. L., Aird, S. D and Kaiser, L. L. 1988. Physiological and immunological properties of small myotoxins from the venom of the midget faded rattiesnake (*Crotalus viridis concolor*). *Toxicon*. 26, 319-323.

Parker, J. M. R.; Guo, D. & Hodges, R. S. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. *New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data:*

Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X- ray-Derived Accessible Sites. 25, 5425–5432.

Pellequer, J. L.; Westhof, E. & Regenmortel, M. H. V. 1993. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunology Letters*, 36, 83–100.

Pinho, F.M.O., Perreira, I.D.P. 2001. Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 47 (1), 24-29.

Purcell, A. W.; McCluskey, J. & Rossjohn, J. 2006. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 404–414.

Regenmortel, M. H. V. V. 2001. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*, 29, 209–213.

Rodrigues-Simioni, L., Hawgood, B.J., Smith, I.C. 1990. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. *Toxicon* 28, 1479–1489.

Rodríguez J. P., De Marzi, M., Marunak, S., Malchiodi, E. L., Leiva, L. C., Acosta, O. 2006. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Med (B. Aires)*. 66, 512-516.

Saha, S., Bhasin, M., Raghava. 2005. Bcipep: A database of B-cell epitopes. *BMC Genomics*. 6 (79), 1-7.

Saha, S. and Raghava, G. P. S. 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 65(1), 40–48.

Sampaio, S. C., Hyslop, S., Fontes, M. R., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V. O., Magro, A. J. 2010. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxic. *Toxicon* 55, 1045-1060.

Santos Filho, O. A., Alencastro, R. B. 2003. Modelagem de proteínas por homologia. *Química nova*. 26, 253-259.

Sivalingam, G. N., Shepherd A. J. 2012. An analysis of B-cell epitope discontinuity. *Mol Immunol* 51(3-4), 304-3099.

Soares, A.M., Mancin, A.C., Cecchini, A.L., Arantes, E.C., França, S.C., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R. 2001. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 877–888.

Springnolli, R. L., Mendes, G. E., Burdman, A. 2011. Acute Kidney Injury Caused by Bothrops Snake Venom. *ephron Clin Pract.* 119, c131–c137.

Sun, J., Wu, D., Xu, T., Wang, X., Xu, X., Tao, L., Li, Y.X., Cao, Z.W. 2009. SEPPA: a computational server for spatial epitope prediction of protein antigens. *Nucleic Acids Res.* 37, 612-616.

Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., Griffiths, E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 41 (5), 541-557.

Trier, N.H., Hansen, P.R., Houen, G. 2012. Production and characterization of peptide antibodies. *Methods* 56(2), 136-144.

Van Regenmortel. 2001. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals.* 29 (3-4), 209-213.

Vital Brazil, O., Excell, B.J. 1971. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond* 212, 34P

Vital Brazil, O., Fontana, M.D., Heluany, N.F. 2000. Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. *J. Nat. Toxins* 9, 33–42.

Vita Brazil, O., Prado-Franceschi, J., Waisbich, E. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin – toxicity. *Mem. Inst. Butantan,* 33, 973-980.

VITAL BRAZIL. Informe Vital. Acessoria de Comunicação do Instituto Vital Brazil. Rio de Janeiro: Nova Imprensa Oficial, 2013

Vonk, F. J., Jackson, K., Doley, R., Madaras, F., Mirtschin, P and Vidal, N. 2011. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. *BioEssays* : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, v. 33, n. 4, p. 269–79,

Wang , Z., Jiyuan, Y., Su, C., Xinyuan, Q., Lijie, T., Yijing, L. 2015. Development of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection based on porcine epidemic diarrhea virus monoclonal antibodies. *Viral immunology* 28, 184-189.

Westhof, E.; Altschuh, D.; Moras, D.; Bloomer, A.; Mondragon, A.; Klug, A. & Regenmortel, V. 1984. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature*, 311, 123–126.