

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**PRODUÇÃO DE SORO ANTIELAPÍDICO ATRAVÉS DA**  
**IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DAS**  
**PRINCIPAIS TOXINAS DO VENENO DA SERPENTE *MICRURUS***  
***CORALLINUS***

**Karen Larissa Pereira de Castro**

**Belo Horizonte**

**2014**

**Karen Larissa Pereira de Castro**

**PRODUÇÃO DE SORO ANTIELAPÍDICO ATRAVÉS DA  
IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DAS  
PRINCIPAIS TOXINAS DO VENENO DA SERPENTE *MICRURUS  
CORALLINUS***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez  
Olórtegui

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Clara Guerra Duarte

**Belo Horizonte**

**2014**

*Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas, localizado na Universidade Federal de Minas Gerais. E contou com o apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.*

Karen Larissa Pereira de Castro

**Produção de soro antielapídico através da imunização de animais com peptídeos sintéticos das principais toxinas do veneno da serpente *Micrurus corallinus***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Carlos Delfín Chávez Olortegui (Orientador)

---

Clara Guerra Duarte (Co-Orientadora)

---

Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo

---

Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

---

Dr. Eládio Sánchez Flores.

*A D<sup>na</sup> Clarinda, que agora pode caminhar pelos mais belos jardins da casa do Pai.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Chavez Olortégui, pela orientação e ensinamentos, que tornaram possíveis a realização deste trabalho.

A Dr.<sup>a</sup> Clara Guerra Duarte, pelo carinho, paciência, confiança, disponibilidade e co-orientação fundamentais para a realização do trabalho.

Aos membros da banca Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine, Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo e ao Dr. Eládio Sánchez Flores, pela disponibilidade e presença, enriquecendo o meu desenvolvimento científico.

A Fundação Ezequiel Dias por fornecer as amostras de veneno utilizadas neste trabalho. Aos animais experimentais que tornaram este trabalho possível.

A todos os colegas de laboratório pela amizade, companheirismo, por dividirem seus conhecimentos e sempre ajudar nos momentos necessários.

À Fernanda e Stephanie, pelas risadas, pelo apoio nos momentos difíceis, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

À Daysi, minha companheira desde a iniciação científica, que se tornou uma grande amiga.

À Camila, Gabizinha, Andréa, Thaís pelo carinho, pelos almoços, conselhos, bons momentos, trocas de conhecimento.

Ao professor Ricardo Andrés, aos colegas Luis Minozzo e Francisco Schneider pela amizade, disponibilidade e contribuições científicas.

Às professoras Liza e Rafaela e aos colegas Felipe, Luana, Camila, Fabiana por contribuírem para tornar o ambiente de trabalho muito agradável.

Às agências de fomento que tornaram o desenvolvimento deste trabalho possível.

À todas as pessoas que tornam o andamento do ICB possível: aos seguranças, faxineiros, técnicos, bioteristas e estudantes.

Ao meu pai e a minha mãe, que sempre me apoiam na decisão de ser uma cientista, sempre carinhosos e atenciosos. Ao meu irmão por sempre me ajudar e estar ao meu lado.

À todos os membros da minha família, tios, tias, primas e primos pelo amor, carinho, presença e compreensão. Ao meu padrinho, à minha madrinha e afilhados. À minha querida vó que enquanto presente neste plano da vida sempre incentivou meus estudos.

À Erna e ao Marco por continuarem sempre presentes na minha vida. Em especial a Erna que se tornou como uma segunda mãe para mim.

Ao Rafael que mesmo distante se faz presente, que mesmo sempre ocupado demonstra seu carinho.

Aos meus amigos. Mesmo que não possamos estar sempre juntos fisicamente, estão sempre em meu coração.

Aos amigos da Biologia por sempre me darem apoio, especialmente Luiz, Mari, Ana Clara, Aline, Nathália.

A todos aqueles que de alguma maneira tornaram este trabalho possível.

*“There's far too much to take in here  
More to find than can ever be found  
But the sun rolling high through the sapphire sky  
Keeps great and small on the endless round”*



## RESUMO

No Brasil, a família Elapidae é representada por serpentes do gênero *Micrurus*. Os acidentes causados por este gênero são considerados graves devido aos efeitos neurotóxicos observados em humanos. A espécie *Micrurus corallinus* possui em seu veneno pelo menos duas classes de neurotoxinas: fosfolipases A<sub>2</sub> e Toxinas de Três Dígitos. O tratamento para envenenamento é a administração intravenosa do soro antielapídico. Os centros de tratamento têm problemas na produção de soro antielapídico, pois as serpentes desse gênero são de difícil manutenção em cativeiro e possuem glândula de veneno de tamanho reduzido, o que resulta em baixas concentrações de veneno disponíveis. O objetivo principal deste trabalho é preencher esta lacuna através do desenvolvimento de novas estratégias para a produção de antiveneno elapídico, utilizando peptídeos sintéticos representando epitopos das principais toxinas de *M.corallinus* identificados pela técnica de SPOT. Após a análise das membranas de SPOT e das sequências das proteínas com o software Epitopia, nove peptídeos foram escolhidos, localizados em estruturas 3D e utilizados para a imunização de coelhos. Dois animais foram imunizados com veneno de *M.frontalis* e peptídeos de *M.corallinus*, e dois foram imunizados apenas com peptídeos sintéticos. Após um segundo ciclo de imunizações, o soro dos coelhos de ambos os grupos foi capaz de reconhecer o veneno de diferentes espécies do gênero *Micrurus* em testes de ELISA, e de neutralizar completamente a atividade fosfolipásica dos venenos. Além disso, os animais imunizados com veneno e peptídeos foram capazes de neutralizar 100% da atividade letal de *M.corallinus*. Estes resultados nos encorajam a utilizar peptídeos sintéticos para o desenvolvimento de antivenenos.

**Keywords:** Veneno da serpente *Micrurus corallinus*; Toxinas de Três Dígitos (3FTX), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), epitopos, peptídeos sintéticos.

## ABSTRACT

In Brazil, the Elapidae family is represented by snakes from the *Micrurus* genus. The accidents caused by this genus are considered dangerous because of its neurotoxicity in humans. The species *Micrurus corallinus* has at least two classes of neurotoxins in its venom: phospholipase A<sub>2</sub> and three fingers toxins. The treatment for poisoning is intravenous administration of anti-elapidic serum. Treatment centers have problems with antiserum production, because this genus is difficult to maintain in captivity and has a reduced venom gland, resulting in low amounts of venom available. The overall goal of this work is to fill in this gap by developing strategies for the production of elapidic antivenom, using synthetic peptides representing biologically immune relevant epitopes identified by the SPOT technique from the major toxins of *M.corallinus*. After analysis of SPOT membranes and of the proteins sequences with Eptopia software, nine peptides were chosen, localized in a 3D structures, chemically synthesized and used to immunize rabbits. Two rabbits were immunized with *M.frontalis* venom and peptides from *M.corallinus* toxins and two rabbits only with peptides. After the second cycle of immunization, the sera of rabbits of both groups were able to recognize the venom from different species from the *Micrurus* genera in ELISA assays, and to fully neutralize the phospholipase A<sub>2</sub> activity. Also, the animals immunized with venom and peptides were capable of neutralizing 100% of the lethal activity of *M.corallinus* venom. These results encourage the utilization of synthetic peptides for the development of anti-elapidic serum.

**Keywords:** *Micrurus corallinus* snake venom; Three-Finger Toxins (3FTx); Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>); Epitopes; Synthetic peptides

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição da família Elapidae pelo mundo. ....	21
<b>Figura 2:</b> Crânio de serpente proteróglifa. ....	22
<b>Figura 3:</b> Espécies de <i>Micrurus</i> comuns no Brasil. ....	23
<b>Figura 4:</b> A serpente <i>Micrurus corallinus</i> .....	24
<b>Figura 5:</b> Distribuição da serpente <i>Micrurus corallinus</i> no Brasil .....	24
<b>Figura 6:</b> A serpente <i>Micrurus frontalis</i> .....	25
<b>Figura 7:</b> Distribuição do complexo <i>Micrurus frontalis</i> no Brasil. ....	26
<b>Figura 8:</b> Notificações de acidentes por serpentes no ano de 2007-2012. ....	29
<b>Figura 9:</b> Classificação final dos casos de envenenamento por serpentes nos anos 2007-2012. .....	30
<b>Figura 10:</b> Casos de envenenamento por <i>Micrurus</i> registrados de acordo com os Estados, no período de 2007-2012. ....	30
<b>Figura 11:</b> Ocorrências de acidentes por <i>Micrurus</i> ao longo do ano. ....	31
<b>Figura 12:</b> Perfil da composição do veneno de <i>M.corallinus</i> .....	34
<b>Figura 13:</b> Estruturas tridimensionais de toxinas de três dígitos (3FTx). ....	35
<b>Figura 14:</b> Sítio de ligação da ACh no receptor de acetilcolina.. ....	37
<b>Figura 15:</b> Soro antielapídico produzido pelo Instituto Butantan.....	42
<b>Figura 16:</b> Esquema de imunizações para realização de testes em membrana de SPOT.....	47
<b>Figura 17:</b> Imunização de animais com peptídeos sintéticos correspondentes às toxinas de <i>M.corallinus</i> .....	48
<b>Figura 18:</b> Imunização de animais com veneno de <i>M. frontalis</i> e peptídeos sintéticos correspondentes às toxinas de <i>M.corallinus</i> .....	49
<b>Figura 19:</b> Gel de eletroforese sob condições redutoras.. ....	61
<b>Figura 20:</b> Western Blot.SDS Page do veneno de <i>M.frontalis</i> .....	62
<b>Figura 21:</b> Reatividade das membranas de SPOT frente a diferentes soros anti elapídicos. ..	64
<b>Figura 22:</b> Análise das sequências das toxinas através do software Epitopia. ....	69
<b>Figura 23:</b> Sequências de peptídeos escolhidas correspondentes a cada toxina.....	70
<b>Figura 24:</b> Propriedades físico químicas dos peptídeos escolhidos dentre as toxinas de <i>M.corallinus</i> .....	71

<b>Figura 25:</b> Estruturas 3D das proteínas estudadas com os respectivos peptídeos marcados..	72
<b>Figura 26:</b> Modificações realizadas nas sequências de peptídeos para sua síntese química...	73
<b>Figura 27:</b> Reatividade do pool soros dos animais imunizados frente ao veneno de <i>M.corallinus</i> .....	74
<b>Figura 28:</b> Reatividade dos soros dos animais imunizados com veneno de <i>M.frontalis</i> e peptídeos sintéticos .....	75
<b>Figura 29:</b> Reatividade dos soros dos animais imunizados com peptídeos de <i>M.corallinus</i> ..	76
<b>Figura 30:</b> Reatividade das imunoglobulinas dos animais imunizados com veneno de <i>M.frontalis</i> e peptídeos sintéticos. ....	77
<b>Figura 31:</b> Reatividade das IgGs dos animais imunizados com peptídeos de <i>M.corallinus</i> .	78
<b>Figura 32:</b> Reatividade das IgGs dos animais imunizados com peptídeos de <i>M.corallinus</i> frente ao veneno de <i>M.leminiscatus</i> .....	79
<b>Figura 33:</b> Reatividade dos soros $\alpha$ peptídeos frente a cada peptídeo após o fim do primeiro ciclo (em roxo) e o fim do segundo ciclo (em azul).....	80
<b>Figura 34:</b> Neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.frontalis</i> pelas IgGs $\alpha$ <i>M.frontalis</i> e Peptídeos do coelho 1(A) e 2(B) .....	81
<b>Figura 35:</b> Média da neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.frontalis</i> pelas IgGs $\alpha$ <i>M.frontalis</i> e Peptídeos.....	82
<b>Figura 36:</b> Neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M. corallinus</i> pelas IgGs $\alpha$ <i>M.frontalis</i> e Peptídeos do coelho 1(A) e 2(B).....	82
<b>Figura 37:</b> Média da neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.corallinus</i> pelas IgGs $\alpha$ i e Peptídeos. ....	83
<b>Figura 38:</b> Neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.frontalis</i> pelas IgGs $\alpha$ peptídeos do coelho 1(A) e 2(B) .....	83
<b>Figura 39:</b> Média da neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.frontalis</i> pelas IgGs $\alpha$ peptídeos.....	84
<b>Figura 40:</b> Neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.corallinus</i> pelas IgGs $\alpha$ peptídeos do coelho 1(A) e 2(B) .....	84
<b>Figura 41:</b> Média da neutralização da atividade fosfolipásica de <i>M.corallinus</i> pelas IgGs $\alpha$ peptídeos.....	85

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Bioatividades das 3FTXs com toxicidades características.....	37
<b>Tabela 2:</b> Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0036C (fosfolipase A2) frente aos soros utilizados.....	66
<b>Tabela 3:</b> Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0599C frente aos soros utilizados.....	66
<b>Tabela 4:</b> Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0604C frente aos soros utilizados.....	66
<b>Tabela 5:</b> Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0039C frente aos soros utilizados.....	67
<b>Tabela 6:</b> Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0100C frente aos soros utilizados.....	68
<b>Tabela 7:</b> Soroneutralização do veneno de <i>M.corallinus</i> .....	85
<b>Tabela 8:</b> Soroneutralização do veneno de <i>M.frontalis</i> .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa – Aminoácidos

ABS – Absorbância

Acetil CoA – Acetil coenzima A

ACh – Acetilcolina

AgNO<sub>3</sub> – Nitrato de Prata

BCIP – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato

BSA – Albumina de Soro Bovino

Ca<sup>2+</sup> – Íon cálcio

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio

CENADI – Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos

CETEA – Comitê de Ética de Experimentação Animal

CBS – Tampão Citrato Salina

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DIPC – Diisopropilcarbodiimida

DL<sub>50</sub> – Dose Letal Média

3FTX – Toxinas de Três Dígitos

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

HCl – Ácido Clorídrico

HOBT – hidroxibenzotriazol

IgGs – Imunoglobulinas

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MPD – Dose fosfolipásica mínima

MTT – 2H-tetrazólio, 2 - (4,5-dimetil-2-tiazolil) -3,5-difenil-, brometo

nAChR – Receptor nicotínico de acetilcolina

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de Sódio

PBS – Tampão Fosfato Salina

PI – Pré imune

SDS Page – eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil-sulfato de sódio de pH –

Pla<sub>2</sub> – Fosfolipases do tipo A<sub>2</sub>.

Potencial Hidrogeniônico

P/V – Peso por Volume

RPM – Rotações por Minuto

SAA – Soro antiaracnídico

SAEla – Soro antielapídico

SALox – Soro antiloxocélico

SAV – Soroterapia antiveneno

V/V – Percentagem Volúmica

ZN<sup>2+</sup> – Íon Zinco

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

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



## SUMÁRIO

1.1	As serpentes.....	20
1.2	Família Elapidae .....	21
1.3	O gênero <i>Micrurus</i> .....	22
1.3.1	A espécie <i>Micrurus corallinus</i> .....	23
1.3.2	A espécie <i>Micrurus frontalis</i> .....	25
1.4	Epidemiologia dos acidentes elapídicos .....	26
1.4.1	No mundo .....	26
1.4.2	No Brasil.....	28
1.5	Composição do veneno das serpentes do gênero <i>Micrurus</i> .....	31
1.5.1	Toxinas de três dígitos-3FTX .....	34
1.5.2	Fosfolipases A <sub>2</sub> .....	38
1.6	O envenenamento por serpentes do gênero <i>Micrurus</i> .....	39
1.7	O tratamento: Soro Antielapídico.....	40
1.8	Biotecnologia peptídica e produção de antivenenos .....	42
1.9	Justificativa .....	44
2	OBJETIVOS .....	45
2.1	Objetivos Gerais .....	45
2.2	Objetivos Específicos .....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Animais, venenos e soros.....	46
3.2	Imunização de animais.....	46
3.2.1	Para a realização de teste em membrana de SPOT .....	46
3.2.2	Para a imunização com peptídeos sintéticos.....	47

3.3 Purificação de Imunoglobulinas (IgGs).....	49
3.4 Dosagem de proteínas.....	50
3.5 SDS Page.....	50
3.6 Western Blot.....	51
3.7 Técnica de SPOT.....	52
3.7.1 Síntese de peptídeos em membranas de celulose.....	52
3.7.2 Imunoensaio de SPOT.....	53
3.7.3 A regeneração da membrana.....	54
3.7.4 Análise da reatividade.....	54
3.8 Alinhamento das sequências das 3FTXs.....	54
3.9 Predição de imunogenicidade.....	55
3.10 Análise das propriedades físico-químicas.....	55
3.11 Modelagem molecular.....	55
3.12 Síntese de peptídeos sintéticos.....	55
3.12.1 Dosagem de peptídeos.....	57
3.13 ELISAS.....	57
3.13.1 Soros/IgGs frente ao veneno de <i>Micrurus</i> sp.....	57
3.13.2 Soros anti peptídeo frente aos peptídeos sintéticos.....	58
3.14 Atividade fosfolipásica.....	59
3.14.1 Neutralização da atividade fosfolipásica.....	59
3.15 Neutralização da Dose letal.....	60
4 RESULTADOS.....	61
4.1 SDS – Page.....	61
4.2 Western Blot.....	61
4.3 Imunoensaio de SPOT.....	62
4.4 Predição de Imunogenicidade.....	68

4.5 Escolha das sequências a serem sintetizadas .....	70
4.6 Propriedades Físico químicas.....	71
4.7 Modelagem molecular .....	72
4.8 Síntese de peptídeos sintéticos .....	73
4.9 Testes de ELISA.....	73
4.9.1 Soros/IgGs frente ao veneno de <i>Micrurus</i> sp.....	73
4.9.2 Soros anti peptídeo frente aos peptídeos sintéticos.....	79
4.10 Atividade fosfolipásica .....	80
4.10.1 Neutralização da atividade fosfolipásica .....	81
4.11 Neutralização da atividade letal.....	85
5 DISCUSSÃO .....	86
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 As serpentes

As serpentes, segundo Pough e colaboradores (2008), pertencem à superordem dos Lepidossauria, que formam o maior grupo de Reptilia (exceto aves), ordem squamata. As especializações das serpentes, em comparação a dos lagartos ápodes, refletem duas pressões seletivas, a locomoção e a predação. Ao contrário dos lagartos ápodes, as serpentes possuem especializações morfológicas para engolirem presas maiores que o diâmetro de seu próprio corpo, uma diferença que pode ser uma das chaves no seu grande sucesso evolutivo.

A constrição e o veneno são especializações predatórias que permitem que as serpentes segurem presas grandes, com poucos riscos. As serpentes peçonhentas com presas inoculadoras anteriores (Viperidae e Elapidae) apresentam especializações de um sistema de inoculação ancestral (Pough, *et al*, 2008). Pesquisas recentes determinaram que a origem da peçonha em répteis ocorreu a aproximadamente 170 milhões de anos, durante o período Jurássico (Fry *et al.*, 2012).

O veneno presente nos squamatos são armas químicas com uma grande diversidade de funções e papéis biológicos. Sua função primária possivelmente é incapacitar o sistema locomotor da presa, para prevenir sua fuga antes da morte. As secreções orais produzidas pelos squamatos, além de promover a morte da presa, exercem inúmeros outros papéis como lubrificação, digestão, defesa, dentre outros (Westein; Smith & Kardong, 2010).

As serpentes peçonhentas, segundo Pough e colaboradores (2008), são agrupadas em quatro famílias, pertencentes à superfamília Colubroidea, sendo elas:

- Viperidae: aproximadamente 228 espécies de médio a grande porte (2 metros), nas quais as especializações do maxilar permitem que as presas inoculadoras permaneçam na horizontal quando a boca está fechada. Cerca de 60 espécies são víboras verdadeiras e são encontradas na Eurásia e na África. Víboras com fosseta loreal são encontradas na Ásia e na África. Não ocorrem na Austrália e Antártida.

- Elapidae: cerca de 300 espécies de serpentes peçonhentas que possuem presas canaliculadas próximas a região cranial em um maxilar relativamente imóvel. Ocorrem em todos os continentes exceto na Antártida. As serpentes marinhas pertencem a esta família.

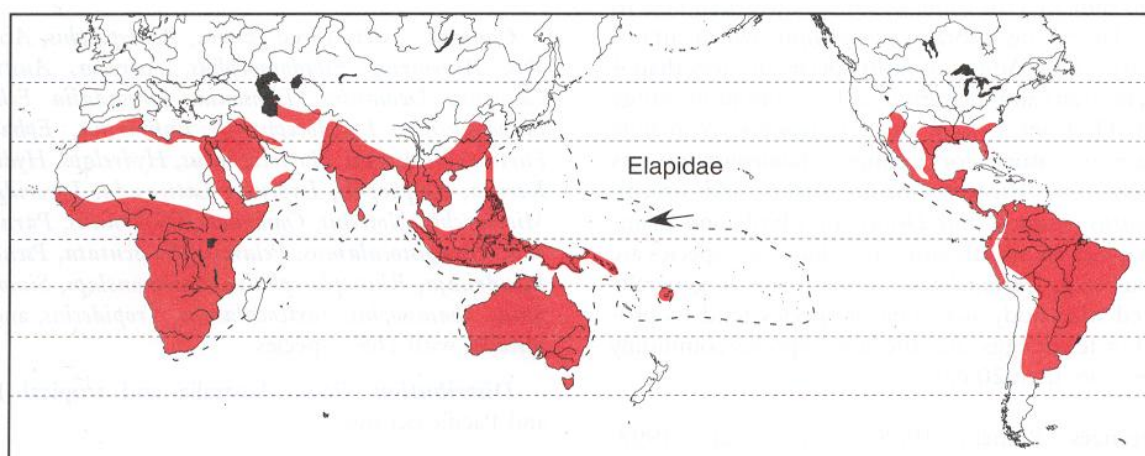
*Micrurus* e *Micruroides* são os representantes vivos da subfamília Elapinae no Novo Mundo. *Micruroides* são as cobras corais da América do Norte e *Micrurus* são as cobras corais das Américas do Sul e Central principalmente. (Franco, 2009).

- Colubridae: mais de 1800 espécies incluindo serpentes de pequeno à grande porte, encontradas exceto na Antártida. Não possuem presas inoculadoras canaliculadas especializadas para injetar veneno, apesar de que muitas espécies possuem glândulas que secretam veneno.

- Atractaspidae: 18 espécies de serpentes de pequeno a médio porte que ocorrem na África e na Ásia. Apresentam geralmente hábitos fossoriais. Possuem presas alongadas, muitas vezes precedidas por vários dentes menores.

## 1.2 Família Elapidae

A família Elapidae é distribuída por toda a faixa intertropical do planeta, nos ambientes terrestres, aquáticos e marinhos (Pough, 2008). Esta família possui cerca de 62 gêneros distribuídos desde os Estados Unidos até a América do Sul, também sendo encontradas na Ásia, África e Austrália. As serpentes afro-asiáticas são as mais tóxicas conhecidas no mundo (Figura 1). Nas Américas, existem mais de 120 espécies e subespécies, divididas em três gêneros: *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus*, que possui cerca de 70 espécies (Tanaka *et al.*, 2010).



**Figura 1:** Distribuição da família Elapidae pelo mundo. Em vermelho, regiões do globo onde encontram-se exemplares destas espécies.

Estas serpentes, segundo Pough e colaboradores (2008) possuem dentição proteróglifa, ou seja, as presas inoculadoras sulcadas estão localizadas na porção cranial do maxilar, como demonstrado na figura 2, são fixas e relativamente curtas.



**Figura 2:** Crânio de serpente proteróglifa. Nota-se à presença de presas especializadas na inoculação de veneno, localizadas na região anterior da maxila. Fonte: objetoseducacionais2.mec.gov.br

### 1.3 O gênero *Micrurus*

O gênero *Micrurus* (Micro = pequeno; Urus = Cauda) ocorre desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos. É dividido em mais de 120 espécies e subespécies, possuindo grande diversidade no Equador. O gênero é de importância médica significativa, pois os acidentes causados pelas espécies de *Micrurus spp.* são considerados potencialmente graves devido a neurotoxicidade do veneno observada em acidentes envolvendo humanos (Cecchini *et al.*, 2005; Melgarejo, 2009).

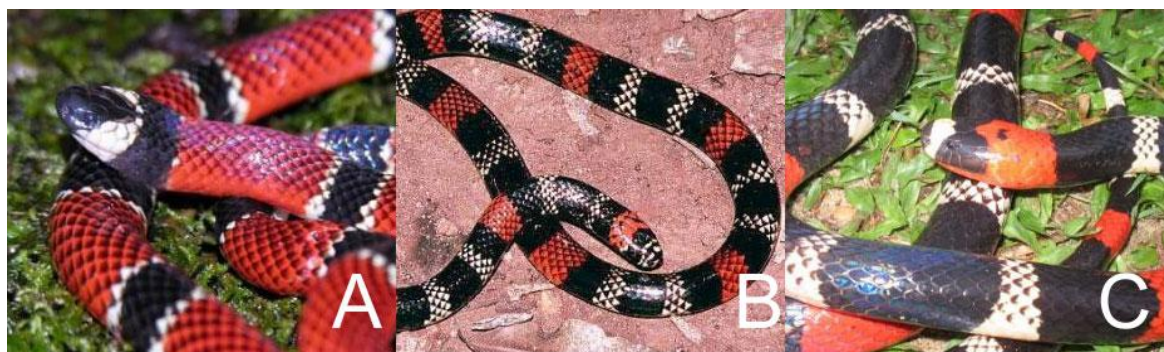
As serpentes do gênero são caracterizadas pela coloração aposemática marcante, apresentando anéis completos em torno do corpo. São consideradas serpentes pequenas, de 60 cm (centímetros) a 1,60 m. As escamas que recobrem o corpo são lisas, a cauda é roliça e pequena. A cabeça oval não apresenta fossetas loreais, sendo os ossos craniais fortes, especializados para escavação (Moreira *et al.*, 2010).

*Micrurus* é o gênero da família Elapidae mais presente nas Américas. Quase todas as serpentes do gênero dependem de ambientes florestais e as espécies apresentem atividade diurna e noturna (Leão, 2008). As serpentes deste gênero compreendem 18 espécies

distribuídas no território brasileiro, das quais as mais comuns são *Micrurus corallinus* (Figura 3-A), encontrada na região sul e litoral da região sudeste, *Micrurus frontalis* (Figura 3-B), encontrada na região sul, sudeste e parte da região centro-oeste e *Micrurus lemniscatus* (Figura 3-C), distribuída nas regiões norte e centro oeste (Pinho & Pereira, 2001).

A alimentação das espécies do gênero é especialista. A maioria das espécies se alimenta de serpentes menores, mas também de gimnofionas e anfisbenias (Marques & Sazima, 1997) o que faz com que a criação das espécies do gênero *Micrurus* em cativeiro seja bastante complicada.

São conhecidos no Brasil por coral, coral verdadeira, boicorá ou ibiboboca. As corais não são muito agressivas, possuem habitat subterrâneo e uma abertura bucal reduzida. Quando atacam humanos, geralmente picam os dedos das mãos de pessoas que as manipulam (Pinho & Pereira, 2001).



**Figura 3:** Espécies de serpentes do gênero *Micrurus* comuns no Brasil. (A) *Micrurus corallinus*, (B) *Micrurus frontalis*, (C) *Micrurus lemniscatus*. Fonte: The Reptile Database, 2011 – Modificada.

### 1.3.1 A espécie *Micrurus corallinus*

A espécie *Micrurus corallinus* (Figura 4) apresenta maior atividade no período diurno. Os espécimes variam de 19 a 104 cm. Sua dieta é composta de anfisbenídeos, gimnofionas, lagartos, roedores neonatos e de outras serpentes (Marques & Sazima, 1997).

Esta espécie possui hábitos fossoriais, abrigando-se em troncos em decomposição, entre raízes e pedras. *M. corallinus* não é uma espécie agressiva e os acidentes ocorrem, geralmente, quando manuseada (Museu Instituto Butantan, 2008). É uma das corais mais

comuns na região Sul e Sudeste, habitando principalmente o litoral, desde Ilhéus até Santa Catarina e o noroeste do Rio Grande do Sul (figura 5) (Melgarejo, 2009).

*M. corallinus* possui a cabeça preta com faixa transversal branca. O padrão de coloração inclui anéis pretos envoltos por anéis brancos e intercalados por anéis vermelhos. É uma das espécies mais comuns nas regiões sul e sudeste, principalmente no litoral (CIT, 2014).



**Figura 4:** A serpente *Micrurus corallinus*. Suas características morfológicas incluem uma faixa transversal branca na cabeça preta. Fonte: Centro de informações toxicológicas de Santa Catarina.



**Figura 5:** Distribuição da serpente *Micrurus corallinus* no Brasil. Em laranja, regiões onde a espécie é encontrada. Fonte: Museu Instituto Butantan



### 1.3.2 A espécie *Micrurus frontalis*

As características morfológicas da espécie incluem o focinho preto com a borda das escamas branca (Figura 6). Distribui-se do estado brasileiro do Paraná ao Uruguai, Argentina e leste do Paraguai. No Brasil, é encontrada nas regiões sul, sudeste e centro oeste (Figura 7) (Silva & Sites 1999; Pinho & Pereira 2001; Melgarejo, 2009).

É a coral verdadeira mais abundante e de maior distribuição no cerrado Brasileiro, preferindo temperaturas como as encontradas na região sudeste brasileira (Souza *et al.*, 2006), sendo a mais diversa das serpentes corais triadais (Silva & Sites, 1999). São preferencialmente ofiófagas, mas em sua dieta também se incluem anfisbaenios. (Jorge da Silva & Aird, 2001)

A peçonha demonstra ação na atividade pós-sináptica, possuindo uma grande variedade de toxinas de três dígitos (3FTX) (Moreira *et al.* 2010), um dos componentes não enzimáticos mais comuns do veneno de serpentes elapídicas, que possui afinidade e seletividade ao receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), afetando a transmissão sináptica. (Moreira *et al.* 2010; Sunagar *et al.* 2013).



**Figura 6:** A serpente *Micrurus frontalis*. O focinho preto com a borda das escamas brancas é uma marcante característica morfológica. Fonte: [www.fauparaguay.com](http://www.fauparaguay.com).



**Figura 7:** Distribuição das serpentes do complexo *Micrurus frontalis* no Brasil. Em laranja regiões onde a espécie é encontrada. Fonte: Museu Instituto Butantan

## 1.4 Epidemiologia dos acidentes elapídicos

### 1.4.1 No mundo

As serpentes da família Elapidae fazem parte da infraordem Caenophidia que contém mais de 80% das espécies encontradas no mundo. Estas serpentes são distribuídas nas faixas tropicais e subtropicais, incluindo as Américas, África, Ásia, Melanésia, Austrália e os Oceanos Índicos e Pacíficos (Keogh, 2006).

Os casos mais severos de envenenamento a nível mundial são causados por serpentes da família Elapidae (kraits, mambas, espécies da Australásia e serpentes marinhas) e Viperidae (Gutiérrez; Theakston; Warrell, 2006).

O continente Australiano possui uma diversa população de serpentes, predominantemente da família dos elapídeos. Os acidentes causados por serpentes australianas são clinicamente caracterizados pelo envenenamento sistêmico, geralmente com poucos sinais locais (White, 2010).

Poucos dados epidemiológicos são disponíveis acerca dos envenenamentos. Estes demonstram um maior número de casos por picadas de serpentes do gênero *Acanthophis*, o

que reflete uma maior ocorrência destas serpentes nas áreas rurais e urbanas. Picadas por esse gênero são responsáveis pela maioria dos casos fatais no continente australiano, numa média de quatro óbitos por ano (White, 2010).

A África possui um grande número de casos de mortalidade por envenenamento, principalmente pela escassez de antivenenos, má qualidade e dificuldades de acesso aos serviços de saúde (Gutiérrez; Theakston; Warrell, 2006).

A maioria das 400 a 1000 mortes que ocorrem por ano são causadas por serpentes do gênero *Naja* (Pinho & Pereira, 2001). Najas e mambas, juntamente com as biútas e “carpet vipers”, representam as serpentes africanas mais perigosas (Del Brutto & Del Brutto, 2012).

No sul Asiático, quatro espécies são responsáveis pela maioria dos casos letais de envenenamento. Estas serpentes são referidas como “big four”, e incluem as espécies: *Bungarus caeruleus*, *Naja naja*, (pertencentes a família elapidae), *Daboia russeli* e *Echis carinatus* (Del Brutto & Del Brutto, 2012).

A família elapidae representada no continente asiático por pelo menos 17 espécies terrestres (incluindo as cobras reais, kraits e corais) e numerosas espécies marinhas. Picadas de *Naja* (conhecidas por dilatar o pescoço quando se sentem ameaçadas) tipicamente ocorrem no horário da tarde. A espécie *Naja naja*, uma das mais comuns da Índia, causa numerosos casos de acidentes por ano. A espécie *N.kaouthia* também é de importância médica no norte Indiano (Alirol *et al.*, 2010).

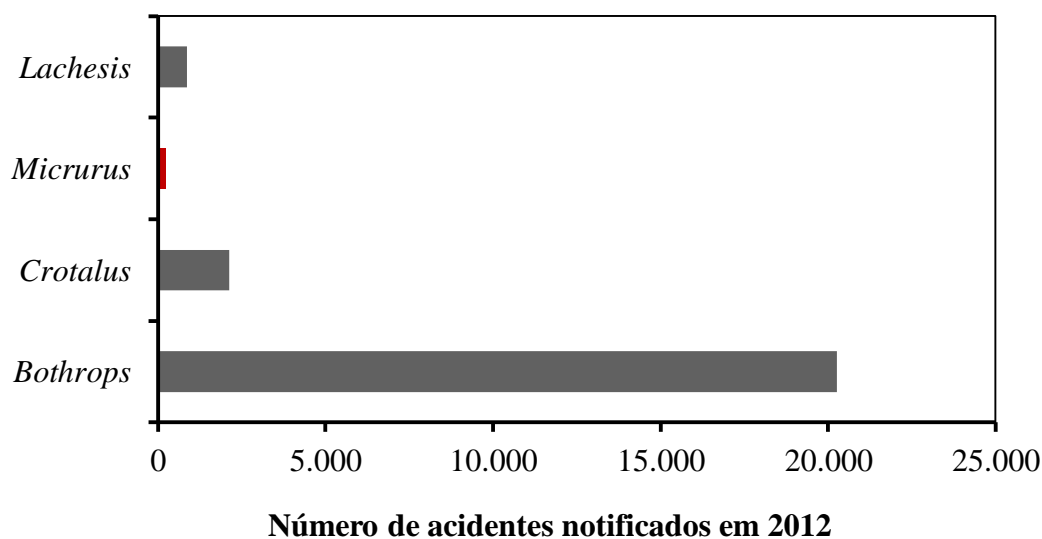
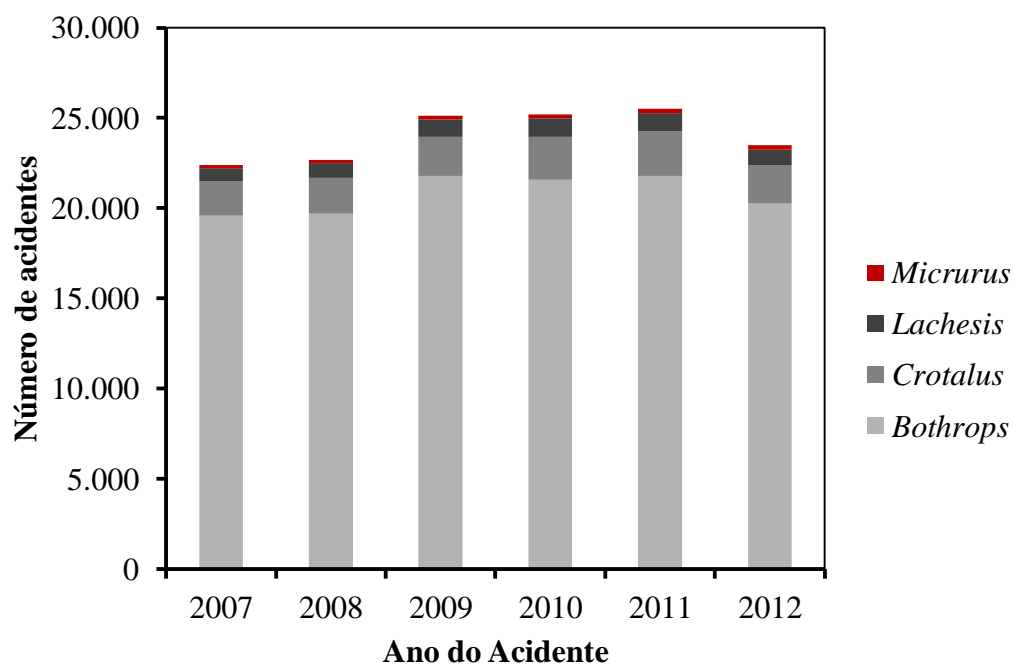
O envenenamento por kraits é fatal em 77-100% dos casos não tratados. A maior parte dos casos é causada pela espécie *Bungarus caeruleus*. No caso das corais, poucos casos são descritos, porém, fatalidades já foram reportadas (Alirol *et al.*, 2010)

Estima-se que 200.000 mil casos de envenenamento por picada de serpentes ocorrem nas Américas por ano. A maioria destes casos é causada por espécies da subfamília Crotalinae, enquanto que picadas por corais são responsáveis por apenas 5% dos casos. Apesar disso, a alta toxicidade da peçonha dessa serpente combinada com a marcante neurotoxicidade pode levar a paralisia respiratória e conseqüentemente à morte. Todos os casos de envenenamento por corais devem ser considerados emergência médica (Béarnard-Valle *et al.*, 2014).

### ***1.4.2 No Brasil***

O primeiro estudo epidemiológico de acidentes ofídicos no Brasil foi realizado por Vital Brazil em 1901. Em agosto do mesmo ano Vital Brazil entregou as primeiras ampolas de soros anti-peçonha para consumo, e passou também a distribuir o “Boletim para Observação de Accidente Ophidico” (Struchiner, 2003). O programa Nacional de Ofidismo no Brasil, porém, iniciou-se tardiamente em junho de 1986, em decorrência de uma crise na produção de soro, que culminou com a morte de uma criança em Brasília. Nesta época, os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação compulsória no país. A notificação obrigatória tornou-se essencial, devido à crise na produção de soro, visto que o Ministério da Saúde adquiriu diversos soros produzidos, racionalizando a oferta do produto a nível nacional, e estabeleceu cotas de soros para as Secretarias Estaduais de Saúde, de acordo com a demanda apresentada por cada estado (Bochner & Struchiner, 2002).

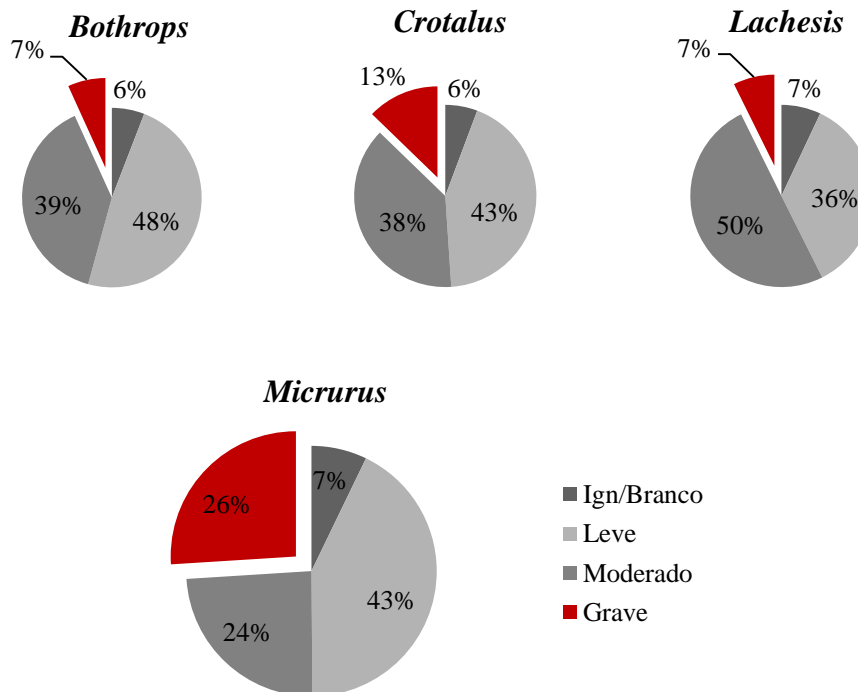
Segundo o Ministério da saúde (2013) e segundo os dados do ano de 2012 do Sistema de Informação de Agravos de notificação (2014) (figura 8), a distribuição entre os casos notificados, indica um predomínio de acidentes botrópicos, seguido de casos causados pelos gêneros *Crotalus*, *Laquesis*, *Elapidae* e por serpentes não peçonhentas. O número de casos registrados está relacionado com a sazonalidade, bem como os períodos de atividade humana no campo, o que determina um período de incidência nos meses quentes e chuvosos, em indivíduos adultos, do sexo masculino durante o trabalho na zona rural.



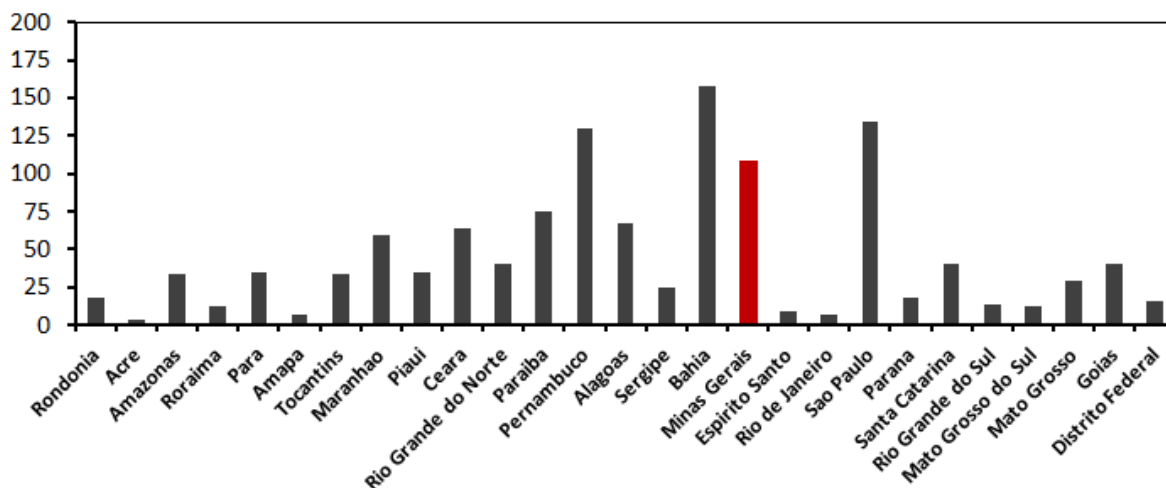
**Figura 8:** Notificações de acidentes por serpentes no ano de 2007-2012. Em destaque (vermelho) acidentes causados por serpentes do gênero *Micrurus*.

Nos anos de 2007 a 2012, foram registrados 1127 casos de acidentes causados por serpentes do gênero *Micrurus* no Brasil, sendo 319 deles (26%) considerados graves, um maior percentual se comparado com acidentes de serpentes de outro gênero, como observado na figura 9. Os estados de maior notificação foram respectivamente: Bahia, Pernambuco, São

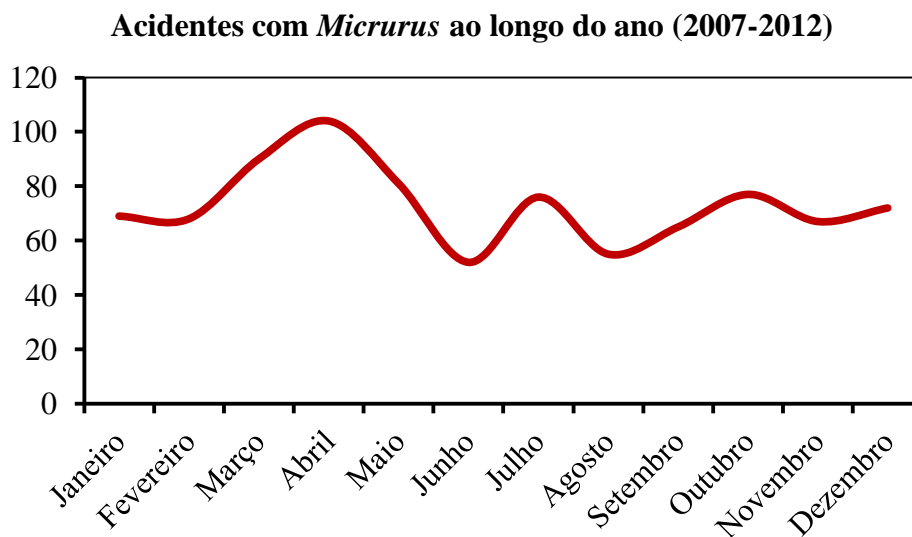
Paulo e Minas Gerais (Figura 10), a maior parte dos casos ocorreu nos meses de março a abril (Figura 11) (SINAN, 2014).



**Figura 9:** Classificação final dos casos de envenenamento por serpentes nos anos 2007-2012. Em vermelho, casos de envenenamento considerados graves. Fonte: Ministério da Saúde.



**Figura 10:** Casos de envenenamento por serpentes do gênero *Micrurus* registrados de acordo com os Estados brasileiros, no período de 2007-2012. Fonte: Ministério da Saúde.



**Figura 11:** Ocorrências de acidentes causados por serpentes do gênero *Micrurus* ao longo do ano. Fonte: Ministério da Saúde.

### 1.5 Composição do veneno das serpentes do gênero *Micrurus*

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, a cascata de coagulação, os sistemas nervoso e cardiovascular e a homeostase em geral. As toxinas possuem grande precisão e atividade biológica (Vonk *et al.*, 2011).

Os venenos possuem composição variada, e os mecanismos que controlam suas variações e produção não são completamente entendidos. São adaptações para facilitar a captura da presa, e 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).

Apesar das corais serem conhecidas por seus venenos neurotóxicos, poucas sequências de toxinas responsáveis por esses efeitos foram determinadas. Essas toxinas bloqueiam a transmissão neuromuscular, de acordo com diferentes mecanismos de ação. O veneno de

*Micrurus corallinus*, por exemplo, foi classificado como possuidor de atividade pré e pós-sináptica, pois causa o bloqueio dos receptores da placa terminal bem como causa a inibição da liberação de acetilcolina nos nervos motores terminais. Já *Micrurus frontalis* e *Micrurus lemniscatus* demonstram somente atividade pós-sináptica (Moreira *et al.*, 2010).

Lectinas do tipo C são proteínas não enzimáticas presentes em diversos venenos ofídicos. Grande parte delas possui capacidade de ligação com carboidratos, e na presença de  $Ca^{2+}$ , iniciam diversos processos biológicos como aglutinação, adesão, endocitose e neutralização de patógenos. Elas atuam como agonistas ou antagonistas da agregação plaquetária e afetam a trombose e homeostase através da ativação e inibição de receptores específicos de membranas de plaquetas (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009; Jiang *et al.*, 2011). Exceto pela espécie *M.corallinus*, as lectinas elapídicas são inclusas no grupo de lectinas verdadeiras (Jiang *et al.*, 2011).

Peptídeos natriuréticos já foram descritos no veneno de diversas espécies de serpentes, com precursores organizados de diversas maneiras. A família dos peptídeos natriuréticos exerce funções de controle da natriurese, da diurese, da pressão sanguínea, da homeostase e da inibição da secreção da aldosterona em todos os vertebrados, sendo usado pelo veneno das serpentes para a interrupção desses processos nas presas (Ho *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2011).

As metaloproteases de venenos ofídicos englobam uma complexa subfamília de enzimas dependentes de zinco que exercem uma variedade de atividades biológicas como: hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose e respostas inflamatórias (De Oliveira Junior; Silva Cardoso; Franco, 2013). Todas elas possuem um domínio proteolítico que é caracterizado pela presença de um sítio catalítico conservado, responsável pela ligação com um íon metálico, comumente o  $Zn^{2+}$ . Seguido ao sítio catalítico, pode existir um domínio de desintegrina, capaz de ligar com integrinas de plaquetas ou de células epiteliais. Não são enzimas muito abundantes e diversificadas nos elapídeos. (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009; Jiang *et al.*, 2011).

L-aminoácido oxidases são grandes enzimas de 58 kDa e atuam em L-aminoácidos, convertendo-os em ceto ácidos, gerando água oxigenada, o que contribui para a inibição da agregação plaquetária. (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009; Jiang *et al.*, 2011)

Os inibidores Kunitz pertencem à superfamília de inibidores semelhantes à tripsina pancreática bovina, com função ancestral de inibir diversas ações de serino proteases. Possuem cadeia de cerca de 60 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto. No veneno das serpentes, estes inibidores ocorrem de duas maneiras funcionais distintas: inibidor de



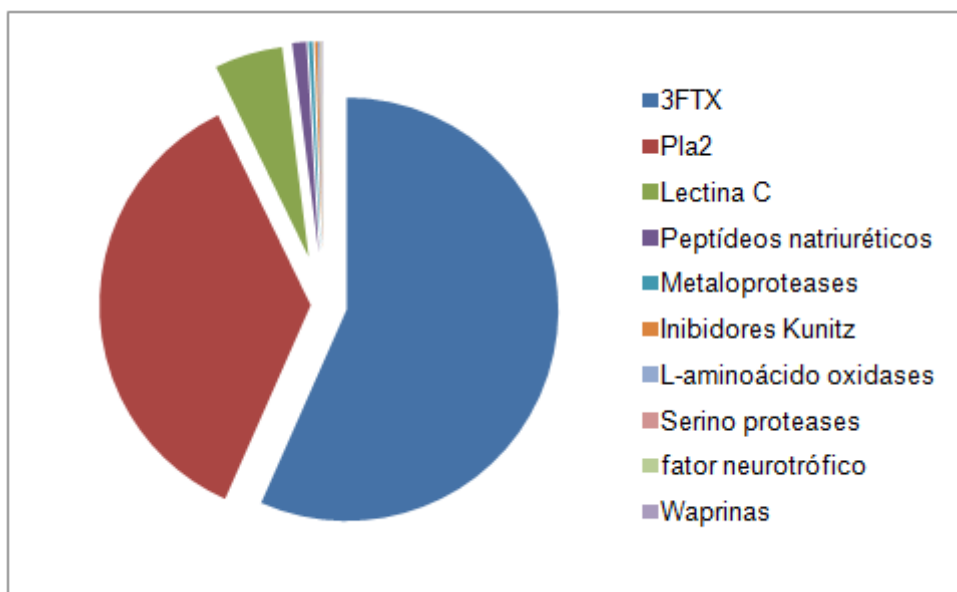
serino protease não neurotóxico e inibidor de serino protease neurotóxico, ou dendrotoxina. As dentrotoxinas causam aumento da liberação de neurotransmissores, como acetilcolina, em membranas pré-sinápticas colinérgicas (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009; Jiang *et al.*, 2011).

Serino proteases atuam em elementos da cascata de coagulação, de maneira não específica, através de degradação proteolítica, ou específica pela ativação ou inativação de fatores de coagulação envolvidos na agregação plaquetária. Podem participar de diversas atividades biológicas, como diferenciação celular, homeostase e até digestão da presa. (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009; Zaqueo *et al.*, 2014).

Waprininas atuam possivelmente como inibidoras de proteases. Geralmente seu domínio consiste de 50 resíduos de aminoácidos, com 8 resíduos conservados de cisteínas formando quatro pontes dissulfeto (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009).

Fatores neurotróficos do veneno agem como agonistas de receptores de tirosina quinase, competindo com fatores neurotróficos externos pela ligação com o receptor e influenciando na ação colinérgica dos neurônios. Também exercem efeitos não neuronais, como induzir o aumento na liberação de histamina por células sanguíneas. Seu possível efeito no envenenamento é tornar o local da picada mais susceptível à ação de outros componentes, distribuindo as substâncias que são de difícil absorção pelo tecido alvo. (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009).

O transcriptoma da glândula de veneno de *Micrurus corallinus* demonstrou que a maior parte das toxinas presentes no veneno pertencente à classe das neurotoxinas (Toxinas de três dígitos e fosfolipases A<sub>2</sub>) (Figura 12). Também foi demonstrado que as toxinas de três dígitos (3FTX) são muito diversas em termos de sequências, possivelmente tendo como alvo diferentes tipos de receptores, enquanto as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são mais conservadas. A alta expressão desses dois tipos de neurotoxinas é demonstrada pela presença de atividades pré e pós-sinápticas nos venenos de *Micrurus* (Tanaka *et al.*, 2010). Visto que a maior parte das neurotoxinas são representadas pelas 3FTX e pelas PLA<sub>2</sub>, estas duas classes de toxinas serão descritas de forma detalhada nas sessões posteriores.



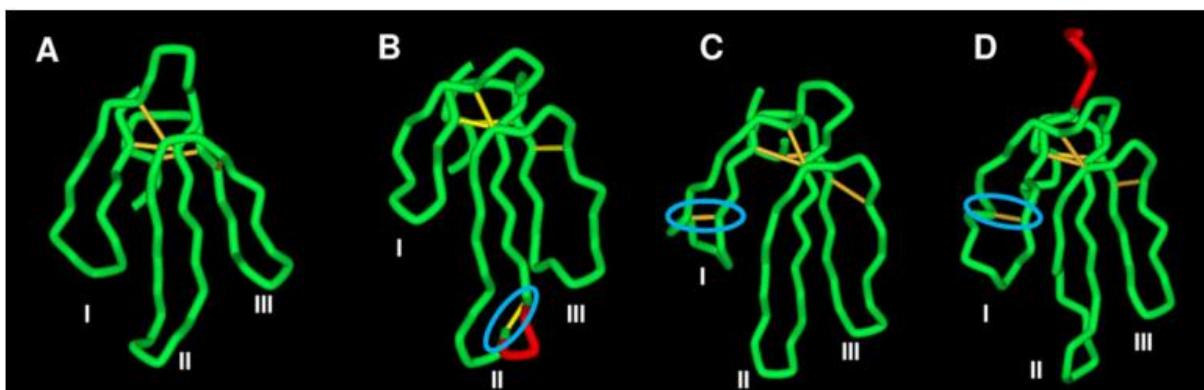
**Figura 12:** Perfil da composição do veneno de *M.corallinus*. Fonte: Leão *et al.* 2009. Modificada

### ***1.5.1 Toxinas de três dígitos-3FTX***

As 3FTX foram os primeiros componentes a serem isolados de venenos de serpentes. Desde sua descoberta, exercem papel importante como objetos de estudo e como ferramentas bioquímicas na pesquisa (Utkin, 2013).

Essas proteínas desprovidas de atividades enzimáticas são pequenas, com menos de 80 aminoácidos e geralmente possuem quatro pontes dissulfeto. Elas têm diferentes efeitos farmacológicos, mas estão geralmente associadas a bloqueio pós-sináptico (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009).

A característica das 3FTX é seu enovelamento típico: três voltas  $\beta$  que se estendem de um pequeno, globular e hidrofóbico núcleo que possui quatro pontes dissulfeto (Figura 13). As três alças que emergem da região central se assemelham a três dedos estendidos da mão. (Kini & Doley, 2010).



**Figura 13:** Estruturas tridimensionais de toxinas de três dígitos (3FTx), demonstrando loops e pontes dissulfeto; (A) De cadeia curta (Erabutoxin). (B) De cadeia longa (k-bungarotoxina) ; (C) Toxina não-convencional (Candoxin); (D) e toxina não-convencional, com extensão N-terminal (Denmotoxin). A extensão da segunda alça de cadeia longa 3FTx devido à quinta ponte dissulfeto e a extensão de terminal-N de denmotoxina é mostrado na cor vermelha. Fonte: Kini & Doley, 2010.

A maior parte das toxinas que possuem essa estrutura pode ser classificada em diversos grupos, baseados em suas funções (Tabela 1). Toxinas longas e curtas são encontradas somente no grupo das neurotoxinas, que bloqueiam a ação nervosa através da competição pelo receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) que está localizado na membrana pós-sináptica dos músculos esqueléticos neuronais (Tamiya & Fujimi, 2006; Sunagar *et al.*, 2013).

Classe	Modo de ação
$\alpha$ Neurotoxinas Básicas	Antagonistas de receptores de acetilcolina $\alpha 1$ , com potencial de ação maior em aves/répteis do que em mamíferos. Causa paralisia flácida.
$\alpha$ Neurotoxinas do tipo I	Antagonistas de receptores e acetilcolina $\alpha 1$ . Causa paralisia flácida.
$\alpha$ Neurotoxinas do tipo II	Antagonistas de receptores e acetilcolina $\alpha 1$ e $\alpha 7$ . Causa paralisia flácida.
$\alpha$ Neurotoxinas do tipo III	Antagonistas de receptores e acetilcolina $\alpha 1$ . Causa paralisia flácida.
$\kappa$ Neurotoxinas	Antagonista do subtipo de receptores

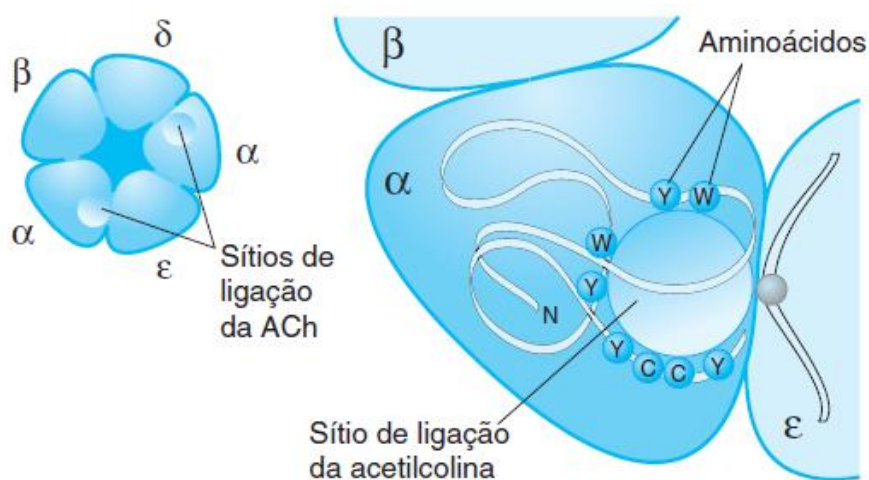
	nicotínicos de acetilcolina $\alpha 3\beta 2$ . Causa paralisia flácida.
Neurotoxinas adrenérgicas/ Muscarínicas	Antagonistas de uma grande variedade de subtipos adrenérgicos e muscarínicos com maior especificidade para subtipos de receptores.
Toxinas muscarínicas do tipo B	Antagonistas dos receptores muscarínicos de acetilcolina do tipo M2.
Bloqueadoras de canais iônicos sensíveis à ácido (ASIC)	Age como uma toxina modificadora do gating por se ligar a canais fechados/inativados ASIC1a-ASIC2a (ACCN2-ACCN1) em neurônios centrais e ASIC1b contendo canais de nociceptores.
Bloqueadoras de canais de cálcio	Antagonistas de canais do tipo L, inibindo a transmissão do potencial de ação.
Inibidoras de acetilcolinesterase	Inibidoras de acetilcolinesterase por ligação competitiva.
Inibidoras de agregação plaquetária	Compete por ligação ao receptor de agregação plaquetária GPIIb/IIIa utilizando o motivo funcional Arg-Gly-Asp, causando o bloqueio da agregação plaquetária.
Citotoxinas	Causa dano celular através da hidrofobicidade da superfície da membrana que interage não especificamente com a camada de fosfolipídios
Sinérgicas	Sozinhas não são tóxicas, mas formam complexos com $\alpha$ neurotoxinas para aumentar dramaticamente aumentando a

	neurotoxicidade.
--	------------------

**Tabela 1:** Bioatividades das 3FTXs com toxicidades características. Fonte: Sunagar *et al.* 2013. Modificada

As  $\alpha$  neurotoxinas, segundo Kini (2002), antagonizam os receptores musculares de acetilcolina (nAChR). A acetilcolina (ACh) é sintetizada em uma única etapa a partir da Acetil Coenzima A (acetil CoA) pela enzima colina acetiltransferase. Após a síntese, a ACh é transportada por vesículas sinápticas para o seu armazenamento. Sua liberação na fenda sináptica ocorre através da fusão da vesícula sináptica com a membrana plasmática, processo dependente da despolarização da terminação axônica e da abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (Golan *et al.*, 2009).

Após a liberação na fenda sináptica, a ACh liga-se a uma de duas classes de receptores, localizados sobre a superfície da membrana da célula pós sináptica. A transmissão colinérgica nicotínica se dá através da ligação de ACh ao nAChR (Figura 14). (Golan *et al.*, 2009).



**Figura 14:** Sítio de ligação da ACh no receptor de acetilcolina. Fonte: Golan et al 2009.

Graças à pressão evolutiva sobre os elapídeos, diversas formas das 3FTXs surgiram, caracterizadas pela perda das cisteínas 2 e 3, o que resultou em uma potenciação das  $\alpha$  neurotoxinas através do desacoplamento da alça 1, o que tornou o formato da proteína mais potente para receptores de mamíferos do que o formato da proteína mais plesiomórfica. O aumento da toxicidade resultou em uma maior expressão de  $\alpha$  neurotoxinas nas glândulas de veneno dessas serpentes (Sunagar *et al.*, 2013).

As  $\alpha$ -neurotoxinas ligam-se aos receptores colinérgicos da placa terminal produzindo bloqueio da transmissão nervosa no músculo esquelético e causam a paralisia da presa. Atuam assim, de modo semelhante ao alcalóide curare, porém com maior afinidade ao receptor e menor reversibilidade. Devido ao seu mecanismo de ação, as  $\alpha$ -neurotoxinas são também conhecidas como toxinas curaremiméticas ou toxinas pós-sinápticas (Nirthanan & Gwee, 2004).

### **1.5.2 Fosfolipases A<sub>2</sub>**

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são um grupo distinto de enzimas abundantes em venenos de serpentes. Possuem diversas propriedades farmacológicas como miotoxicidade, formação de edema, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, cardiotoxicidade e agregação plaquetária. (Perumal Samy, *et al.*, 2008). São proteínas de 120 a 130 resíduos de aminoácidos, que são ligados por sete pontes dissulfeto. A ação enzimática é caracterizada pela hidrólise da ligação tipo Ester (Sn-2) em glicerofosfolipídeos, com a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídeos. As fosfolipases do grupo I são encontradas no pâncreas de mamíferos, bem como no veneno de serpentes da família elapídae e colubridae. O grupo IA é representado por elapídeos, e o grupo IIA característico de venenos de viperídeos e crotalídeos. (De Oliveira *et al.*, 2003; De Oliveira Junior; Silva Cardoso; Franco, 2013)

As fosfolipases do grupo I tipicamente contêm 115-120 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto. Podem ser subdividas no grupo IA e IB. Aquelas do grupo IA, possuem como característica um loop chamado elapídico, que conecta a  $\alpha$ -hélice catalítica e a folha  $\beta$ . As integrantes do grupo IB possuem um loop nomeado pancreático, sendo encontradas no pâncreas de mamíferos (Doley; Zhou; Kini, 2010).

Os venenos elapídicos são intensamente estudados como fontes de fosfolipases A<sub>2</sub> de ação pré-sináptica, que exercem papel na captura da presa por causar bloqueio na transmissão neuromuscular. A morte decorrente dessa toxina é causada por paralisia respiratória. A toxicidade das PLA<sub>2</sub> presentes nos venenos de *Micrurus* no sistema nervoso periférico foi demonstrada pelo isolamento de uma PLA<sub>2</sub> do veneno de *Micrurus dumerilli*. A ação da toxina causou um bloqueio neuromuscular em preparações com o nervo-muscular de

vertebrados além de alterações na distribuição de neurotransmissores na região terminal de neurônios motores (De Carvalho *et al.*, 2014)

As PLA<sub>2</sub> neurotóxicas bloqueiam as terminações nervosas, pois se ligam com receptores de membrana neuronal, e catalisam a hidrólise de fosfolídeos, produzindo lisofosfolídeos e ácidos graxos. Esses componentes alteram a conformação das membranas, causando um aumento da fusão de vesículas sinápticas via hemifusão, com liberação de neurotransmissores e inibição da fissão e reciclagem da vesícula. Num estágio mais tardio da ação, outras mudanças nos nervos terminais ocorrem, como o aumento da permeabilidade da membrana plasmática para íons e internalização das toxinas, o que resulta em perda funcional e estrutural dos nervos terminais (De Carvalho *et al.*, 2014).

Além dessa ação neurotóxica, as PLA<sub>2</sub> estão envolvidas na digestão da presa, exibindo diversos efeitos farmacológicos que influenciam em processos fisiológicos da presa ou das vítimas. Um mesmo veneno pode conter inúmeras isoenzimas do tipo PLA<sub>2</sub>, e essas isoenzimas podem induzir a distintos efeitos farmacológicos. (Doley; Zhou; Kini, 2010; Kopper *et al.*, 2013).

## **1.6 O envenenamento por serpentes do gênero *Micrurus***

Diversas manifestações locais e sistêmicas do envenenamento foram descritas em pacientes picados por diferentes espécies do gênero *Micrurus*. Estudos experimentais demonstraram que o veneno desse gênero é cardiotoxíco, miotóxico, hemolítico, hemorrágico e edematogênico. Além disso, atividades enzimáticas também foram detectadas, incluindo as derivadas de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hialuronidase, fosfodiesterase, leucino- amino oxidase, L- aminoácido desidrogenase, L- aminoácido oxidase, acetilcolinesterase e alcalino fosfomonoesterase. A neurotoxicidade é caracterizada por uma ação pós-sináptica, através do bloqueio da placa terminal por alfa neurotoxinas, como observado no veneno de *M. frontalis*, ou pela atividade pré-sináptica que causa inibição de acetilcolina no nervo terminal, observada no veneno de *M. corallinus* (Tanaka *et al.*, 2010).

O diagnóstico do envenenamento por corais pode não ser preciso. O local da picada pode ser de difícil visualização e algumas vezes não ocorre sudorese. Os sintomas de envenenamento incluem náuseas, vômitos, dores de cabeça, dores abdominais, diaforese,

parastesia, disfonia, disfagia ou insuficiência respiratória que culmina com insuficiência respiratória. Os sintomas podem demorar de 12 ou mais horas para ocorrer. O monitoramento do estado respiratório do paciente é importante, bem como o suporte respiratório, que não deve demorar quando iniciarem-se os sintomas. A cura dos sintomas neurológicos pode levar semanas. Pacientes envenenados descritos sofreram danos neurológicos que levaram a paralisia de três a cinco dias após o tratamento com antivenenos (Quan, 2012).

Do ponto de vista clínico, o envenenamento é classificado como local e sistêmico. As manifestações locais são discretas. A marca das presas no local da picada é variável, mas o não encontro destes sinais não afasta a possibilidade do desenvolvimento do envenenamento sistêmico. O edema, se presente, é leve. Já o envenenamento sistêmico é caracterizado pela atividade neurotóxica pré e pós-sináptica do veneno na junção neuromuscular, que culmina com o bloqueio da liberação de acetilcolina e a competição das neurotoxinas com os receptores colinérgicos da placa terminal, ocasionando uma síndrome miastênica aguda. Há relatos das seguintes manifestações clínicas: ptose palpebral, dificuldade de acomodação visual, oftalmoplegia, sialorréia, dispnéia restritiva e obstrutiva. (Silva Júnior & Bucretchi, 2009).

A decisão de tratar o paciente com antiveneno deve ser tomada levando em consideração quais espécies de corais são encontradas na região geográfica onde ocorreu o envenenamento, para analisar qual espécie pode ter causado o acidente. O antiveneno pode não ser eficiente se os sinais neurológicos já se iniciaram (Quan, 2012).

### **1.7 O tratamento: Soro Antielaipídico**

O termo soro é utilizado para indicar imunobiológicos utilizados no tratamento intoxicações causadas pelo veneno de animais peçonhentos, ou por toxinas de agentes infecciosos. Os antivenenos são produtos que contém anticorpos neutralizantes contra o efeito tóxico dos venenos. São produzidos no Brasil pela hiperimunização de cavalos há mais de 100 anos (Silva, 2013).

O Ministério da Saúde adquire a produção de antivenenos dos quatro produtores nacionais (Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil, Fundação Ezequiel Dias e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos). O Ministério da Saúde realiza a distribuição das



cotas de antivenenos aos Estados, tendo em conta os critérios epidemiológicos disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

Os antivenenos são considerados a forma mais eficaz de neutralização da peçonha. Os laboratórios brasileiros estão em processo de adequação às Boas Práticas de Fabricação da ANVISA, o que tornou a distribuição dos nove antivenenos disponíveis no Brasil mais criteriosa, baseada além dos critérios epidemiológicos, aos estoques disponíveis na Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (CENADI). Os soros Antielapídicos (SAEla) (Figura 15), Antiaracnídico (SAA) e Antiloxocélicos (SALox) são considerados de difícil fabricação, sendo disponibilizados protocolos clínicos de utilização destes (Ministério da Saúde, 2014).

A soroterapia antiveneno (SAV) se indicada, é fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados pela maioria dos animais peçonhentos. A dose indicada é a mesma para crianças e adultos, visto que o tratamento objetiva a neutralização da maior quantidade possível de veneno circulante, independente do peso do paciente (Ministério da Saúde, 2001).

Podem ocorrer reações precoces e tardias à soroterapia. A maioria das reações precoces ocorre durante a infusão do antiveneno, sendo consideradas leves. (Ministério da Saúde, 2001). A doença do soro (reação de hipersensibilidade tipo III sistêmica) ocorre 7-10 dias após a injeção do soro. As características clínicas são calafrios, febre, artrite, exantema e algumas vezes glomerulonefrite. O início da doença coincide com o desenvolvimento de anticorpos contra as diversas proteínas presentes no soro antiofídico (Murphy, *et al.*, 2010). A produção de antivenenos utilizando peptídeos sintéticos mimetizando epitopos, pode ser uma estratégia na diminuição de reações do sistema imune dos pacientes frente aos antisoros. Através do uso de peptídeos, a produção de anticorpos pode ser direcionada para regiões específicas de determinadas proteínas. Além disso, avaliação da reação dos peptídeos sintéticos frente a anticorpos específicos pode ser facilmente avaliada utilizando-se o teste de imunoabsorbância (teste de ELISA) visando a detecção da atividade de anticorpos anti-peptídeos (Hancock & O' Reilly, 2005).



**Figura 15:** Soro antielapídico produzido pelo Instituto Butantan. Fonte: Instituto Butantan.

## 1.8 Biotecnologia peptídica e produção de antivenenos

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública em diversas regiões do planeta. (Del Brutto, 2012; Schneider *et al.*, 2014). Atualmente, o soro anti-elapídico é considerado pelo Ministério da Saúde (2014) um soro de difícil fabricação e seu uso deve ser feito de maneira mais criteriosa, baseando-se além dos critérios clínicos epidemiológicos, nos estoques disponíveis no Centro Nacional de Armazenamento e distribuição de Imunobiológicos. A busca de novas alternativas para a produção de soro torna-se essencial.

Peptídeos derivados de sequências de aminoácidos de toxinas não são tóxicos, porém podem ser imunogênicos, e a geração de anticorpos anti-peptídeos capazes de reconhecer o veneno podem ser uma estratégia alternativa na produção de soro convencional. (Duarte *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores demonstraram a eficácia da utilização de peptídeos sintéticos para a produção de antivenenos. Alvarenga e colaboradores (2001) imunizaram animais com peptídeos sintéticos correspondentes a toxinas do escorpião *Tityus serrulatus*, e o soro dos animais imunizados foi capaz de neutralizar os efeitos tóxicos de *T.serrulatus in vitro*. Felicori e outros (2009) avaliaram o uso de peptídeos correspondentes à seis regiões antigênicas da LiD1, (uma proteína dermonecrótica do veneno de *Loxosceles intermedia*), como imunógenos na imunização de coelhos. Animais imunizados com peptídeos foram capazes de neutralizar as atividades dermonecrótica, hemorrágica e formação de edema induzidas por um desafio com LiD1. Duarte *et al.* (2010) identificaram epítopos descontínuos da toxina escorpiônica TsNTxP, imunizando animais com um peptídeo sintético

correspondente a esta toxina. Camundongos imunizados com o peptídeo foram capazes de neutralizar a atividade letal do veneno de *Tityus serrulatus*. Machado de Ávila e colaboradores (2011) identificaram epitopos de anticorpos monoclonais contra a Mutalisina II, uma metaloprotease de ação hemorrágica do veneno de *Lachesis muta muta*. O soro de coelhos imunizados com peptídeos correspondentes aos epitopos identificados produziu anticorpos capazes de reconhecer a Mutalisina II e de proteger os animais contra os efeitos hemorrágicos do veneno de Lachesis.

Peptídeos são biomoléculas que possuem de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, que podem ser sintetizados quimicamente em laboratório. Em comparação com proteínas, são quimicamente versáteis, pois podem ser amidados ou esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados nos grupo amino terminal ou esterificados nas carboxilas terminais, bem como acetilados fosforilados ou sulfatados (Machado *et al.*, 2004).

Somente a síntese química de peptídeos permite a incorporação de aminoácidos de origem não natural e a produção de grandes quantidades de peptídeos puros. Desde a primeira síntese de um dipeptídeo em 1901 por Emil Fisher, a ciência peptídica progrediu largamente com grandes inovações que permitiram a síntese de proteínas de até 200 aminoácidos (Kimmerlin; Seebach, 2005).

Visando a produção de soro, pode-se sintetizar os peptídeos sintéticos para se comportarem como epitopos. Epitopos são estruturas que são reconhecidas por anticorpos. Podem ser conformacionais, ou seja, corresponderem a sítios da proteína compostos por segmentos proteicos descontínuos na sequência de aminoácidos do antígeno, que foram aproximados pelo dobramento proteico, ou lineares, sendo compostos por um único fragmento da cadeia peptídica (Kenneth; Murphy; Travers, 2010).

Os peptídeos de maneira geral são seletivos e eficazes, agindo em seus alvos mesmo em baixas concentrações. Muitos peptídeos já são utilizados como fármacos, e muitos outros estão em fase de testes pré-clínicos e clínicos, sendo utilizados na indústria médica e farmacêutica, principalmente no tratamento do câncer e de distúrbios metabólicos, além de outras condições como alergia, distúrbios imunológicos e doenças cardiovasculares. A aplicação de peptídeos no desenvolvimento de drogas e vacinas vem sendo amplamente estudada (Larin, 2011; Chandrudu; Simerska; Toth, 2013). Algumas das vantagens no uso de peptídeos incluem: eficácia, especificidade, alta atividade e baixa toxicidade, além de possibilitarem a padronização e controle de qualidade. A síntese baseada em F-moc é

atualmente a mais popular escolha na fabricação de peptídeos (Chandrudu; Simerska; Toth, 2013).

## 1.9 Justificativa

O tratamento específico para o envenenamento por corais é a administração por via endovenosa do soro antielapídico (SAE). No Brasil, os laboratórios oficiais que produzem o soro antielapídico bivalente são o Instituto Butantan e a Fundação Ezequiel Dias (Silva, 2013).

O soro anti-elapídico produzido pelo instituto Butantan é produzido pela imunização de cavalos e posterior separação do soro dos cavalos imunizados com veneno de *M. corallinus* e *M. frontalis* e pode neutralizar o veneno das corais brasileiras mais importantes do ponto de vista epidemiológico (Tanaka, 2010; Silva 2013).

As serpentes *M.corallinus* e *M.frontalis* possuem hábitos fossoriais, dieta ofiófaga e padrão de coloração semelhante a outras serpentes (Leão *et. al.* 2009; Vital Brazil, 2013). Geralmente, os animais em cativeiro apresentam sinais de estresse e são alimentados de maneira forçada, por utilização de sonda por via esofágica, o que os torna mais susceptíveis a ação de agentes patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, aumentando o número de óbitos decorrentes do desenvolvimento de patologias como infecção sistêmica, pneumonia e parasitoses (Serapicos & Merusse, 2002). Estes fatores demonstram a dificuldade de obtenção e manutenção destes animais em cativeiro, somados ao tamanho reduzido das glândulas de veneno das espécies. Por isso, os centros de produção brasileiros têm problemas na produção de soro antielapídico e pouquíssimo ou nenhum veneno é destinado aos estudos bioquímicos. Mesmo a quantidade de veneno disponibilizada para obtenção de soro não atende a demanda nacional (Leão, 2008; Leão *et. al.* 2009).

Considerando as dificuldades na produção de soro anti-elapídico no Brasil e a importância médica das espécies do gênero *Micrurus*, faz-se necessário à elaboração de novas estratégias para a produção de anti-veneno. A síntese de peptídeos mimetizando epitopos imunologicamente reativos das principais neurotoxinas do veneno de *M. corallinus* pode ser usada como estratégia de imunização de cavalos e amenizar as demandas na produção de soro em todo território nacional.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Buscar uma nova estratégia de produção de soro anti-elapídico através da imunização de animais com peptídeos sintéticos correspondentes as neurotoxinas do veneno de *M.corallinus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Localizar, através da técnica de SPOT, peptídeos reativos nas sequências de quatro toxinas de Três dígitos e de uma Fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de *M.corallinus*;
- Analisar as sequências escolhidas quanto a sua imunogenicidade;
- Analisar as sequências reativas para a síntese de peptídeos sintéticos;
- Sintetizar peptídeos imunologicamente relevantes correspondentes as principais neurotoxinas de *M.corallinus*;
- Desenvolver e testar diferentes protocolos de imunização (apenas peptídeos ou peptídeo + veneno) para a produção de soro hiperimune em coelhos
- Analisar a capacidade do soro dos animais reconhecer venenos de *Micrurus sp.*;
- Analisar se o soro dos animais é capaz de neutralizar as atividades neurotóxicas do veneno através do teste de neutralização da DL<sub>50</sub>;
- Analisar se o soro dos animais é capaz de neutralizar a atividade hemolítica dos venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais, venenos e soros**

As amostras de venenos das diferentes espécies de *Micrurus* utilizadas neste trabalho, foram gentilmente cedidas pela Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras liofilizadas foram estocadas a -20 °C no escuro, até o seu uso.

Camundongos da linhagem Swiss fêmeas, pesando de 18 a 22 gramas e coelhas fêmeas pesando cerca de 3 quilos foram mantidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Todos os animais receberam água e comida *ad libitum* em um ambiente com condições controladas. Os protocolos de experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA, UFMG).

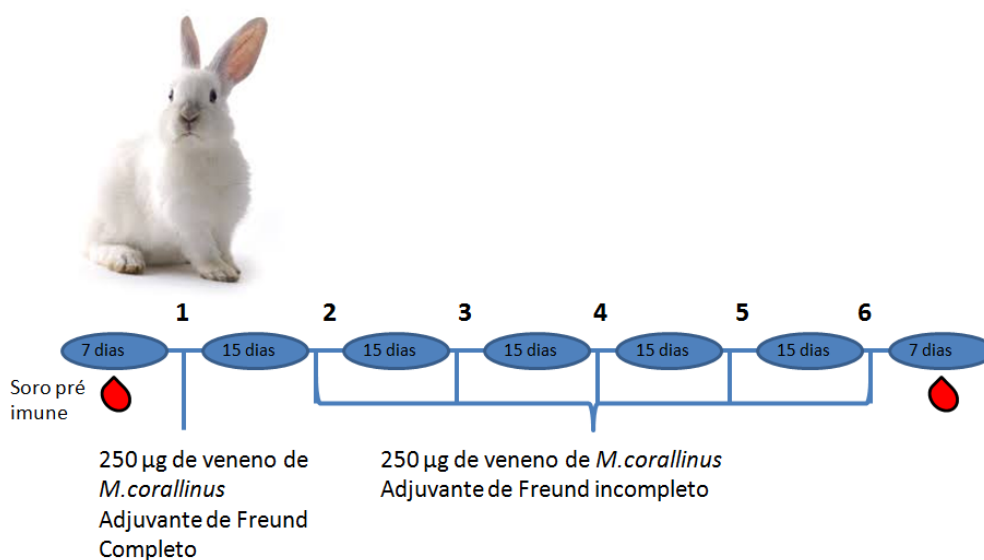
Os antivenenos comerciais bivalentes antielapídicos foram gentilmente cedidos pela Fundação Ezequiel Dias e pelo Instituto Butantan. Os soros foram estocados a 4°C como recomendado pelo fabricante.

#### **3.2 Imunização de animais**

##### ***3.2.1 Para a realização de teste em membrana de SPOT***

Um coelho de aproximadamente três quilos, da linhagem New Zealand, proveniente da Fazenda Experimental Hélio Barbosa da UFMG, foi imunizado de forma ativa seguindo o seguinte protocolo (Figura 16): após a retirada de sangue pré-imune, realizou-se a primeira imunização: 250 microgramas (µg) de veneno de *M. corallinus*, 1,5 mL de adjuvante completo de Freund, e PBS para completar o volume para 2 mL de solução foram homogeneizados e inoculados com uma seringa em quatro pontos da região dorsal do animal.

As cinco imunizações seguintes foram realizadas através do preparo de uma solução de 2 mL contendo 250 µg de veneno de *M.corallinus*, 1,5 mL de adjuvante incompleto de Freund e PBS para completar o volume, homogeneizados e inoculados em quatro pontos na região dorsal do animal. Uma semana após a última dose, amostras de sangue do animal foram coletadas. O soro foi processado pela centrifugação das amostras de sangue a 1500 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos.



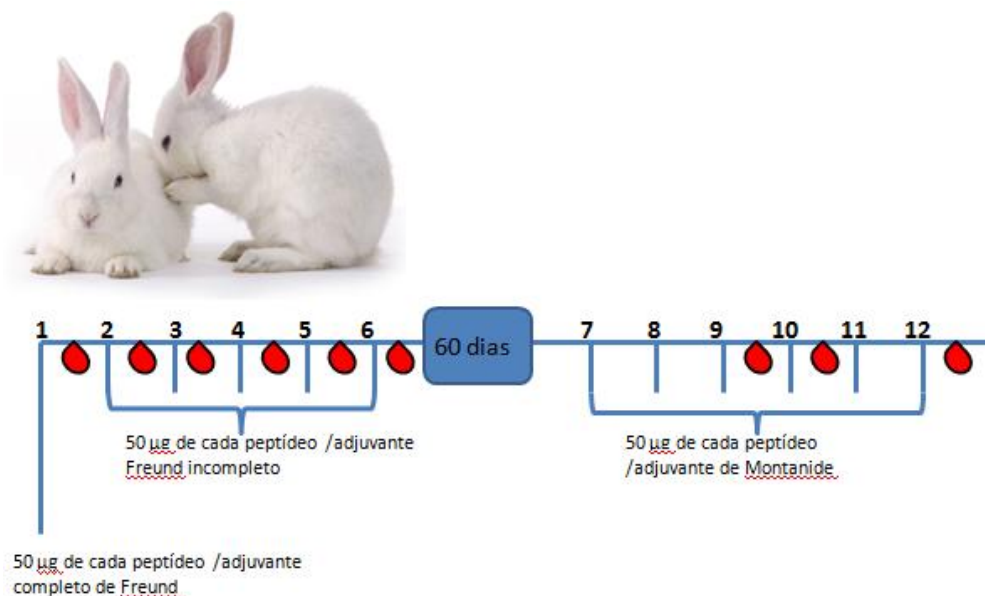
**Figura 16:** Esquema de imunizações para realização de testes em membrana de SPOT. Após a retirada do soro pré imune, realizou-se um ciclo de seis imunizações utilizando-se o veneno de *M.corallinus*. Realizou-se a sangria do animal após sete dias da última imunização. Fonte da imagem: [www.freegreatpicture.com](http://www.freegreatpicture.com)

### 3.2.2 Para a imunização com peptídeos sintéticos

Para imunização com peptídeos solúveis, dois grupos de dois coelhos fêmeas de aproximadamente três quilos, da linhagem New Zealand, foram utilizados. O primeiro grupo foi imunizado com peptídeos sintéticos e o segundo grupo com veneno bruto de *M. frontalis* e peptídeos sintéticos.

Após a coleta do soro pré-imune duas coelhas receberam uma injeção inicial de 50 µg de cada um dos nove peptídeos em 1 mL de adjuvante completo de Freund em PBS para completar um volume total de 2 mL. Cinco injeções subcutâneas de 50 µg de cada peptídeo em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund foram aplicadas em quatro pontos diferentes na

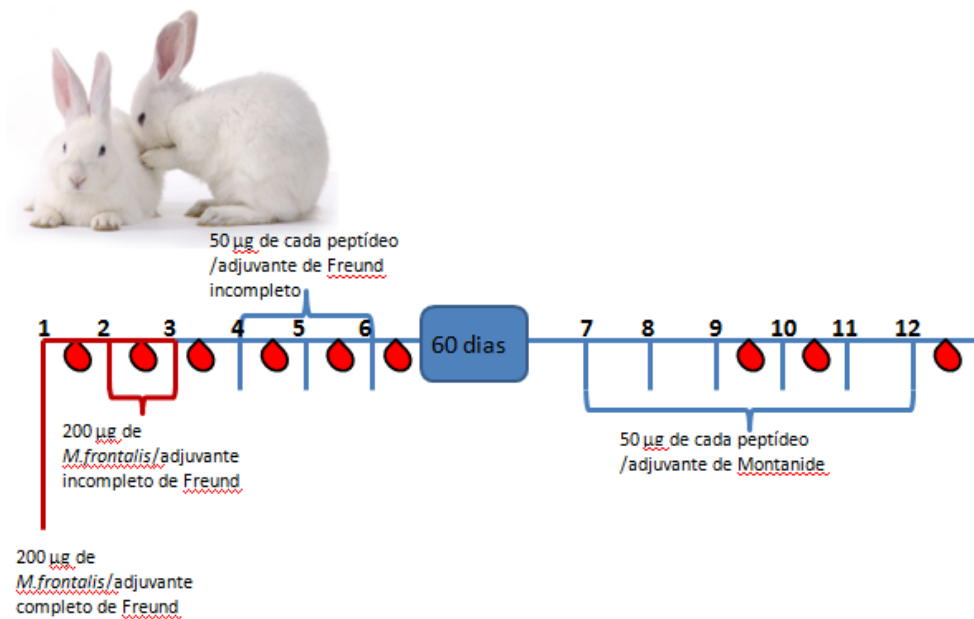
região dorsal do animal, em intervalos de duas semanas cada. Amostras de sangue foram coletadas uma semana após cada injeção (Figura 17).



**Figura 17:** Imunização de animais com peptídeos sintéticos correspondentes às toxinas de *M.corallinus*. Após a retirada do soro pré imune, os animais foram imunizados em dois ciclos de seis doses cada com os peptídeos sintéticos correspondentes as toxinas de *M.corallinus*. Fonte das imagens: <http://hdwallpaper.freehdw.com/>.

Para o segundo grupo (Figura 18), duas coelhas fêmeas New Zealand, após a coleta do sangue pré-imune, receberam uma injeção inicial de 200 µg de veneno bruto de *M. frontalis* em 1 mL de adjuvante completo de Freund em PBS para completar um volume total de 2 mL. Estes animais receberam mais duas injeções subcutâneas em quatro pontos diferentes da região dorsal do animal com 200 µg de veneno, 1 mL de adjuvante incompleto de Freund em PBS para um volume total de 2 mL, aplicados em quatro pontos diferentes na região dorsal do animal, com intervalos de duas semana entre cada dose. Após o último intervalo, três injeções de 50 µg de cada peptídeo em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund foram aplicadas em quatro pontos diferentes na região dorsal do animal, em intervalos de duas semanas cada. Amostras de sangue foram coletadas uma semana após cada injeção.





**Figura 18:** Imunização de animais com veneno de *M. frontalis* e peptídeos sintéticos correspondentes às toxinas de *M. corallinus*. Após a retirada do soro pré imune, os animais foram imunizados em dois ciclos de seis doses cada. As três primeiras imunizações foram realizadas com veneno bruto de *M. frontalis*. As imunizações posteriores foram realizadas utilizando-se os peptídeos sintéticos correspondentes às toxinas de *M. corallinus*. Fonte das imagens: <http://hdwallpaper.freehdw.com/>.

Após um intervalo de dois meses iniciou-se novo ciclo de imunizações com algumas modificações. Todos os animais, de ambos os grupos, receberam mais seis injeções 50 µg de cada peptídeo em 1 mL de adjuvante de Montanide em PBS, num volume total de 2 mL, aplicadas em quatro pontos diferentes na região dorsal do animal, em intervalos de duas semanas cada.

### 3.3 Purificação de Imunoglobulinas (IgGs)

O soro da última imunização dos coelhos imunizados com peptídeos sintéticos apenas e dos coelhos imunizados com veneno bruto de *M. frontalis* mais peptídeos sintéticos, bem como soro pré-imune, foram purificados por precipitação em sulfato de amônio. Adicionou-se gota-a-gota, 1 mL de sulfato de amônio supersaturado em 1 mL de cada amostra, sob agitação e temperatura de 4°C. As soluções permaneceram sob agitação à 4°C overnight. Após este

período, as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM , a 4°C, por 30 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em PBS e as amostras dialisadas por 3 dias em PBS diluído dez vezes. Essa solução foi trocada três vezes ao dia.

Após esse protocolo, seguiu-se uma purificação usando uma coluna de proteína A (GE Healthcare) de acordo com o protocolo descrito por GH healthcare Bio-Sciences AB (2011)

### **3.4 Dosagem de proteínas**

O método utilizado para dosar os venenos foi baseado na metodologia proposta por Marion Bradford (1976). A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

### **3.5 SDS Page**

Amostras de veneno de *M.corallinus*, *M.frontalis* e *M.leminiscatus* foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, de acordo com o método proposto por Laemmli (1970). Foi utilizado gel separação a 12,5% e gel de concentração a 4%. As amostras (7,5 µg) foram diluídas na proporção 1:1 em tampão de amostra (tris-HCl 0,7M, pH 6,8, azul de bromofenol a 0,25% p/v, glicerol 10%v/v, β-mercaptoetanol 2,5% v/v e SDS 4%), homogeneizadas e fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada 30 minutos a 50V e o restante a 150V. Como padrão utilizou-se marcador de peso molecular de proteínas Thermo Scientific.

Para a coloração, utilizou-se o método da prata. O gel foi mergulhado em 100 mL de solução fixadora (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético e 40 µL de formaldeído, em água deionizada) por toda à noite. Posteriormente a solução foi retirada e o gel lavado três vezes por sete minutos em água deionizada. Em seguida, o gel foi colocado em uma solução de tiosulfato de sódio 0,004% por um minuto. Após três ciclos de lavagem em água, o gel foi imerso em 100 mL de uma solução contendo 0,1 g de AgNO<sub>3</sub> e 75 µL de formaldeído em água deionizada. Realizou-se uma rápida lavagem e o gel foi colocado na solução de desenvolvimento (6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6%p/v, 50 µL de formaldeído e 2 mL de tiosulfato de sódio

em água deionizada). Após o aparecimento das bandas, o gel foi retirado da solução e a reação foi interrompida pela solução de parada (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético em água deionizada).

### 3.6 Western Blot

O experimento de Western Blot seguiu o proposto por Stark e colaboradores (1979) com algumas modificações. Para a realização do Western Blot, amostras de o veneno de *M.frontalis* (20 µg) foram aplicadas em tampão de amostra na proporção 1:1 em gel SDS-PAGE, como descrito na sessão anterior. Após a corrida, colocou-se o gel de molho em tampão de transferência (Trizma Base 250 mM, glicina 1,92M em água destilada) por 15 minutos.

Após 10 minutos de molho em água destilada, uma membrana de nitrocelulose foi colocada de molho em tampão de transferência. Deu-se início a transferência, inicialmente a 24 volts por toda a noite e no dia seguinte a 48 volts por uma hora.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 10% a fim de se verificar a presença do perfil de proteínas presentes na amostra. Seguiu-se uma rápida lavagem com água.

O bloqueio 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 1h30 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, as proteínas reativas foram detectadas utilizando DAB/cloronaftol de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.7 Técnica de SPOT

#### 3.7.1 Síntese de peptídeos em membranas de celulose

Pentadecapeptídeos sobrepostos por três resíduos cobrindo toda a sequência das 3FTX de *M.corallinus*: MCOR100C, MCOR0039C, MCOR0064C e da fosfolipase A<sub>2</sub> MCOR0036C (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009) foram sintetizados utilizando o aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) seguindo o protocolo descrito por Laune et al., 2002. O robô foi programado para a deposição de um volume de 0,6 µl de cada aminoácido, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana. O plano de distribuição dos aminoácidos, bem como a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos, foram definidos em programa de computação Multi pep.

Inicialmente, a membrana de celulose foi transformada de modo a disponibilizar grupamentos amino para o acoplamento de aminoácidos, através da esterificação de uma Fluorenilmetiloxicarbonil (FMOC)-βAla-OH às funções hidroxila disponíveis na celulose. Além de tornar o suporte funcional, a adição de um grupamento entre o suporte e o peptídeo tem como objetivo afastar o peptídeo do suporte para garantir sua maior mobilidade e a manutenção da sua conformação.

A síntese dos peptídeos iniciou-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido das sequências estabelecidas para cada ponto. O grupamento protetor FMOC, que se encontrava acoplado à função amina da βAla-OH, foi retirado pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF). O grupo amino se tornou então disponível para reação com o primeiro aminoácido da sequência desejada a ser acoplado. A eficiência da desproteção pode ser monitorada por reação com azul de bromofenol, que apresenta coloração azul quando em contato com grupamentos amina livres e laranja quando esta função se encontra protegida.

Para a síntese dos peptídeos, foram utilizados aminoácidos contendo sua função amina protegida por um grupamento FMOC e com as diferentes cadeias laterais de cada aminoácido também bloqueadas devidamente por grupamentos químicos adequados. Ao serem acoplados, os aminoácidos tiveram sua função carboxila previamente ativada por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida / hidroxibenzotriazol ). Estes ativadores propiciam um rendimento

de ligação variando de 74-87% por ciclo. Os aminoácidos ativados foram então depositados em seus pontos específicos sobre a membrana. Para cada aminoácido, foram realizados dois ciclos de acoplamento. As aminas que por ventura permaneceram livres após os ciclos de acoplamento foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF, a fim de evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados.

Em um próximo ciclo, o grupo protetor FMOC do aminoácido recém-acoplado foi eliminado em meio básico pela piperidina a 20%. A membrana foi lavada com metanol e, após secagem desta, foi iniciado um novo ciclo de acoplamento com o segundo aminoácido. Os ciclos se sucederam desta forma até completar a sequência do peptídeo desejado.

Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos foram retirados pelo tratamento da membrana com ácido trifluoroacético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano.

### **3.7.2 Imunoensaio de SPOT**

Para a avaliação da reatividade de anticorpos frente à membrana de SPOT, diferentes soros foram usados: soro antielapídico bivalente da Fundação Ezequiel Dias, soro antielapídico bivalente do Instituto Butantan e soro de coelho imunizado com veneno bruto de *Micrurus corallinus*, segundo descrito em seção acima. A imunodeteção consiste de duas etapas: a detecção na membrana e sua regeneração. A metodologia empregada foi a proposta por Laune, (2002) com algumas modificações.

As membranas de SPOT foram lavadas em solução fosfato salina (PBS) pH 7,4 e depois bloqueadas com PBS 3% BSA e 0,1% de Tween por toda a noite. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada e incubada com o soro de interesse por 120 minutos. As seguintes diluições foram utilizadas: soro antielapídico da Fundação Ezequiel Dias e do Instituto Butantan 1:10.000 e soro de coelho anti- *M. corallinus* 1:2.000.

A ligação de anticorpos foi detectada pelo uso de anticorpos anti-cavalo secundários ligados a fosfatase (Diluição 1:7500/SIGMA) ou anti-coelho (Diluição 1:2.000/SIGMA), incubados com a membrana após três lavagens de 10 minutos em PBS e tween 0,1%. As regiões reativas da membrana foram visualizadas após a adição do substrato BCIP-MTT em 0,4% de MgCl<sub>2</sub> em tampão citrato salina (CBS) pH 7,0, que forma precipitados azulados sobre

os spots contendo peptídeos reconhecidos por anticorpos dos soros testados. A solução permaneceu em contato com a membrana por 30 minutos, sob agitação. As membranas foram fotografadas para posterior análise.

### ***3.7.3 A regeneração da membrana***

Para reutilizações posteriores, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração, utilizando o metanol para remover os complexos moleculares precipitadas sobre os peptídeos. O tratamento é feito por sucessivas lavagens de 10 minutos, três vezes com dimetilformamida (DMF), três vezes com reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol), três vezes com reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol), e uma última lavagem com metanol ou etanol, para secagem da membrana

### ***3.7.4 Análise da reatividade***

Após a realização do imunoenensaio de Spot, a reatividade dos Spots de cada toxina frente a cada soro foram analisados de maneira visual, atribuindo pontuações de 0 a 5, de acordo com a coloração apresentada pela membrana. Realizou-se também avaliação da reatividade através do programa Image J, que analisa imagens, quantificando os pixels presentes em uma área definida pelo usuário.

## **3.8 Alinhamento das sequências das 3FTXs**

Com objetivo de detectar resíduos conservados das sequências das toxinas de Três Dígitos utilizadas no estudo, utilizou-se a ferramenta ClustalW de alinhamento (Thompson; Higgins; Gibson, 1994).

### **3.9 Predição de imunogenicidade**

Para detectar resíduos de aminoácidos imunogênicos das sequências lineares das quatro neurotoxinas de *M.corallinus* utilizou-se o software Epitopia. Ele utiliza esquema de aprendizagem do sistema para classificar aminoácidos individuais da proteína de acordo com o seu potencial de gerar resposta imune humoral, levando em consideração a potencial exposição de um resíduo ao solvente.

Comparado a outros algoritmos, ele mostrou possuir um maior poder de predição (Rubinstein *et al.*, 2009).

### **3.10 Análise das propriedades físico-químicas**

As propriedades físico-químicas dos peptídeos foram analisadas através do software disponível pela empresa Innovagen (2014), Peptide Properties Calculator e através da ferramenta PepDraw, disponível no portal ExPASy.

### **3.11 Modelagem molecular**

Os peptídeos identificados pela técnica de SPOT foram localizados nas estruturas tridimensionais modeladas de toxinas de *Micrurus*. Os modelos tridimensionais das 3FTX MCOR100C, MCOR0039, MCOR0064C, MCOR0599C e da PLA<sub>2</sub> MCOR0036C foram obtidos baseados na modelagem a partir de estrutura resolvida homóloga, utilizando-se o software Swiss Prot (Guex & Peitsch, 1997; Bordoli *et al.*, 2009).

### **3.12 Síntese de peptídeos sintéticos**

Baseado nos resultados obtidos após a detecção em membrana de SPOT, os peptídeos relacionados com as toxinas de três dígitos PDDFTCVKKWEGGRRV (correspondente aos resíduos 39-55 da toxina MCOR100C), TCPAGQKICFKKWKKG e PKPKKDETIQCCTKNN, correspondendo aos resíduos 37-52 e 64-69 respectivamente da toxina MCOR0039C, LECKICNFKTCPTDELRH e THRGLRIDRGCAATCPTVK (pertencentes a toxina MCOR0604C, correspondendo aos resíduos 22-39 e 54-72), RHASDSQTTTCLSGICYKK e GCPQSSRGVKVDCCMRDK (correspondentes a toxina MCOR0599C, correspondendo aos resíduos 28-45 e 58-75), e os peptídeos que representam a fosfolipase A<sub>2</sub> MCOR0036C NLINFQRMIQCTTRRS AW e NCDRTAALCFGRAPYNN (correspondendo respectivamente aos resíduos 28-45 e 119-137) foram sintetizados em fase solúvel, usando a química baseada em F-moc, através do aparelho ResPep SL. Todas as cisteínas presentes nas sequências foram substituídas por serinas, e uma tirosina foi adicionado nas sequências que não possuíam aminoácidos aromáticos. Após a síntese, os peptídeos foram liofilizados.

Foi utilizado o método desenvolvido por Merrifield em 1963. 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.

Foi utilizada a resina Rink Amide como suporte sólido e aminoácidos com as cadeias laterais protegidas por diferentes grupamentos e o N-terminal protegido por grupamento FMOC. O protocolo utilizado foi semelhante ao utilizado para a síntese em membrana de celulose.

A liberação do peptídeo sintetizado da resina, bem como a clivagem dos grupamentos protetores das cadeias laterais, se deu pelo tratamento com TFA, trietilsilano e etanoditiol. Os peptídeos foram então precipitados com éter etílico resfriado, ressuspensos em água e liofilizados.

Após a síntese, a pureza do peptídeo sintetizado foi atestada por espectrometria de massa (MALDI-TOF).



### 3.12.1 Dosagem de peptídeos

Para a dosagem dos nove peptídeos selecionados, calculou-se a massa de cada peptídeo através da ferramenta ProtParam (Artimo, *et al*, 2012), disponível no portal ExPASy. Um mg de cada peptídeo foi diluído em 1 mL de água Milli-q, exceto o peptídeo NLINFQRM IQCTTRRS AW, correspondente a PLA<sub>2</sub>, que devido a sua baixa solubilidade em água, foi solubilizado primeiramente em 300 µL de TFA, e depois adicionados 700 µL de água Milli-q. Após a diluição, leu-se a absorbância de cada solução a 280 nm em espectrofotômetro Shimadzu.

Para o cálculo da concentração em mg/mL utilizou-se a fórmula:

$$C = \frac{A \times Fd}{Ed} \times \frac{Mw}{1000} = [ ] \text{ mg/mL}$$

Onde C corresponde a concentração, A a absorbância da amostra a 280 nm, Fd o fator de diluição, E ao número de triptofanos presentes da amostra x 5,69 somados a 1,28 x o número de tirosinas presentes na amostra, Mw massa molecular e d diâmetro da cubeta.

## 3.13 ELISAS

### 3.13.1 Soros/IgGs frente ao veneno de *Micrurus sp.*

O método utilizado para detecção de anticorpos específicos foi o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), seguindo o protocolo proposto por Orlortegui e colaboradores (1991) com algumas modificações. Placas de 96 wells (Corning) foram sensibilizadas durante toda a noite a 4°C com 100µL de uma solução de tampão carbonato pH 9.6 contendo 5µg/mL de veneno total de *M. corallinus*, *M. frontalis* ou *M. leminiscatus*. Após a lavagem com solução salina contendo 0,05% de Tween, os poços foram bloqueados com leite em pó 3% em PBS por uma hora a 37°C. Os poços foram lavados novamente e em seguida foram

adicionados soros/Imunoglobulinas pré-imune ou imune de coelhos em diferentes diluições, sendo incubados por uma hora a 37°C. As placas foram lavadas e a IgG anti-coelho conjugada com peroxidase foi incubada por uma hora a 37°C na diluição 1:5.000. Após a lavagem das placas, adicionou-se 100 µl de solução de OPD (Sigma) em cada poço. A reação foi parada 30 minutos depois pela adição de 25 µl de uma solução de ácido sulfúrico (1: 20). Os valores de absorvância foram determinados a 490 nm, usando o leitor de placas de ELISA (BIO-RAD, 680 models). Os experimentos foram realizados em duplicata e as médias e desvios padrões foram calculados.

### ***3.13.2 Soros anti peptídeo frente aos peptídeos sintéticos***

Os nove peptídeos sintéticos foram acoplados utilizando-se glutaraldeído como acoplador. O método de ligação cruzada por glutaraldeído foi feito em apenas um passo, como previamente descrito (Machado de Ávila et al., 2004). Esse acoplamento se baseia na propriedade do glutaraldeído de formar ligações cruzadas, através da formação de uma base de Schiff entre os grupos ε-amino das cadeias laterais de dois resíduos de lisina presentes em duas espécies diferentes de natureza protéica ou ainda entre os grupos N-terminal dos peptídeos.

Para o acoplamento, foram diluídos em 1 ml de PBS 10 mg do peptídeo. Ao longo de 1h, 1 ml de uma solução de glutaraldeído 1% foi adicionado à solução, a 4°C e sob constante agitação. A reação se processou por mais uma hora nessas condições e então foi adicionado NaBH<sub>4</sub> em quantidade suficiente para estabelecer uma concentração final de 10 mg/ml, a fim de reduzir as bases livres eventualmente não ligadas pelo glutaraldeído. A amostra foi dializada contra PBS diluído 10 vezes.

Após a conjugação, placas flexíveis de microtitulação (BD Bioscience, USA) foram sensibilizadas overnight a 4°C com 100µL de uma solução de tampão carbonato pH 9.6 contendo 10µg/mL de cada peptídeo. Os procedimentos posteriores foram os mesmos descritos no tópico 3.13.1.

### **3.14 Atividade fosfolipásica**

A atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> presente nos venenos de *M.corallinus* e *M.frontalis* foi determinada através de um ensaio hemolítico indireto de acordo com o protocolo descrito por Gutierrez e colaboradores em 1988, com algumas alterações. Concentrações crescentes do veneno de *M.corallinus* e *M.frontalis* foram preparadas em um volume final de 15µL, em PBS, e adicionadas separadamente em poços de 3 mm em gel de agarose (0,8% em tampão fosfato salina pH 8.1) contendo 1,2% de eritrócitos de coelhos, 1,2% de gema de ovo, como fonte de lecitina, e 100 mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e os diâmetros dos halos hemolíticos foram medidos. Como controle, utilizou-se 15µL de PBS apenas. Uma unidade fosfolipásica mínima (*Minimum phospholipase Dose- MPD*) corresponde à concentração mínima de veneno que produz um halo hemolítico de 10 mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

#### **3.14.1 Neutralização da atividade fosfolipásica**

Após a determinação da dose fosfolipásica mínima, que corresponde a concentração de veneno capaz de produzir um halo de 1 cm de diâmetro, a capacidade das IgGs purificadas dos soros de coelhos imunizados com peptídeos e imunizados com veneno de *M.frontalis* mais peptídeos foi testada. Concentrações crescentes das IgGs purificadas foram incubadas com veneno de *M. corallinus* o com veneno de *M.frontalis* em PBS a 37°C por 18 horas em uma câmara úmida em agarose 0,8% em tampão fosfato salina pH 8.1 contendo 1,2% de eritrócitos de coelhos. Após a incubação, os halos hemolíticos foram mensurados. Como controles negativos, utilizou-se 15µL de PBS e 15µL de IgG pré imune de coelho. Como controle positivo, 1 MPD do veneno de *M.corallinus* ou *M.frontalis* foi utilizada.

### 3.15 Neutralização da Dose letal

Segundo a literatura, a dose letal estimada de *M. corallinus* é aproximadamente 7.0 µg/kg (Tanaka *et al.*, 2010). Baseado neste dado realizou-se um teste com quatro camundongos swiss pesando de 19 a 22 gramas para analisar se 50% da população sobreviveriam a esta dose. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com a concentração de veneno correspondente a dose letal em uma solução com volume final de 500 µL de PBS-BSA 0,1%.

A dose letal de *M. frontalis* descrita é de 22 µg/kg (Tanake *et al.* 2010). Baseado neste dado realizou-se um teste com seis grupos de quatro camundongos utilizando-se diferentes concentrações de veneno por grupo (8.68 µg, 10.41 µg, 12.5 µg, 15.3 µg, 18.3 µg, e 22 µg). O protocolo de inoculação foi o mesmo utilizado para o veneno de *M. corallinus*. A dose letal encontrada foi de 13.81 µg/kg com 95% segundo o programa Probitus.

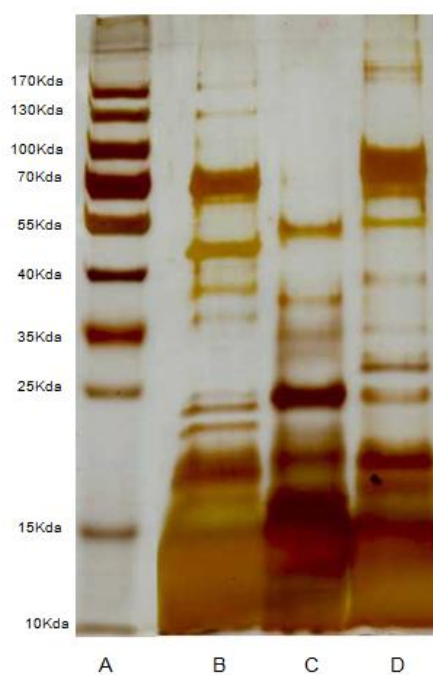
Para ensaios de soroneutralização *in vivo* 32 camundongos swiss foram divididos em 2 grupos a serem desafiados com o veneno de *M. corallinus* ou *M. frontalis*. Cada grupo foi dividido em 4 subgrupos . Cada animal recebeu por via intraperitoneal 500µL de solução contendo 100µL de soro, pré-incubado a 37°C com 1,5 DL<sub>50</sub> do veneno em PBS-BSA 0,1% por uma hora. Os animais dos grupos controle negativo foram inoculados com PBS-BSA 0,1% pré incubado com veneno bruto.

No primeiro subgrupo, os animais receberam soro antielapídico da Fundação Ezequiel Dias como controle; no segundo subgrupo cada animal foi inoculado com um pool dos soros dos coelhos imunizados com Veneno+Peptídeos sintéticos; no terceiro subgrupo cada animal recebeu um pool dos soros dos coelhos imunizados com peptídeos de *M. corallinus*; e no quarto grupo cada animal recebeu PBS pré incubado com 1,5 DL<sub>50</sub> do veneno de *M. corallinus* ou *M. frontalis*. Os resultados foram quantificados 48 horas após a inoculação.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SDS – Page

Para verificar e comparar os perfis proteicos dos venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis*, e *M. lemniscatus*, foram feitas análises por SDS-PAGE. A maioria dos componentes proteicos dos venenos encontra-se na faixa inferior a 60 kDa, como demonstrado na figura 19. É notável também a presença de proteínas de baixo peso molecular abaixo de 15 kDa.



**Figura 19:** Gel de eletroforese sob condições redutoras. (A) Padrão de peso molecular, (B) *Micrurus corallinus*, (C) *Micrurus frontalis*, (D) *Micrurus lemniscatus*.

### 4.2 Western Blot

Para verificar a antigenicidade dos componentes do veneno de *M. frontalis* realizou-se um ensaio de Western Blot. Os soros utilizados para o ensaio foram o soro comercial anti-

elapídico da Fundação Ezequiel Dias, soro de coelho anti- *M.corallinus*, pool dos soros dos coelhos imunizados com peptídeo sintético e pool dos soros dos coelhos imunizados com veneno de *M.frontalis* e peptídeos sintéticos (Figura 20).



**Figura 20:** Western Blot.SDS Page do veneno de *M.frontalis*, 15 µg de veneno por canaleta. (A) Padrão de peso molecular, (B) Soro coelho anti *M.corallinus*, (C) Soro anti elapídico produzido pela FUNED, (D) soro anti *M.frontalis* e anti peptídeos , (E) soro anti peptídeos , (F)Soro pré imune de coelho.

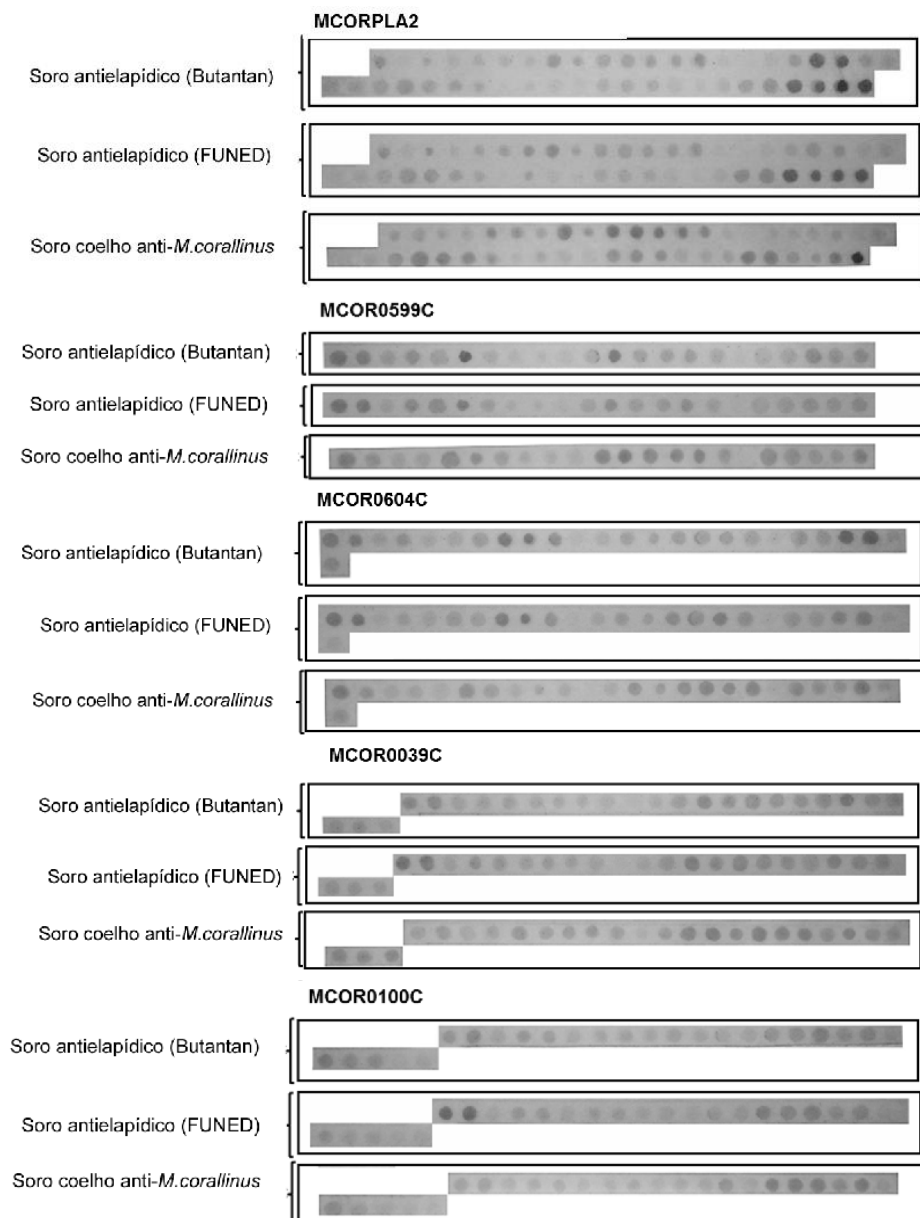
Pela análise do experimento, nota-se a predominância de reconhecimento de proteínas de baixo pelo molecular. A reatividade do soro dos coelhos imunizados com veneno + peptídeos sintéticos mostrou-se semelhante ao padrão de reconhecimento do soro antielapídico da FUNED. O soro dos animais imunizados apenas com peptídeos sintéticos demonstrou ser capaz de reconhecer principalmente proteínas de baixo peso, apresentando reconhecimento menos intenso das proteínas de maior peso.

### 4.3 Imunoensaio de SPOT

Para identificar regiões imunorreativas nas sequências lineares das principais neurotoxinas de *M.corallinus* utilizou-se a técnica de SPOT. Pentadecapeptídeos (15 resíduos sobrepostos por três resíduos) cobrindo toda a sequência das 3FTX Mcor100c (GenBank:

ACS74997.1), Mcor0039c (GenBank: ACS74994.1), Mcor0064c (GenBank: AF197565\_1) e Mcor599c (GenBank: NXAH8\_MICCO), e a sequência correspondente a PLA2 (GenBank: AAN60018) foram sintetizados..

Os soros utilizados foram os soros Anti-elapídicos produzidos pelo Instituto Butantan e pela Fundação Ezequiel Dias e um soro de coelho imunizado com veneno bruto de *M. corallinus* (figura 21). Os spots mais reativos apresentam precipitado de coloração azulada, devido à reação da enzima ligada ao anticorpo secundário com o substrato adicionado, o que permite a análise de quais sequências seriam boas candidatas para a geração de anticorpos. A análise foi feita de maneira visual e utilizando o software ImageJ.



**Figura 21:** Reatividade das membranas de SPOT frente a diferentes soros anti elapídicos.

Pela análise da figura 21 é possível observar que de uma maneira geral, o reconhecimento do peptídeos foi similar para os três soros, com variações de intensidade .

A avaliação da reatividade de cada região da membrana foi feita com objetivo de escolher seqüências reativas de cada toxina para a síntese química de peptídeos solúveis. (Tabelas 2 à 7).

Toxina PLA <sub>2</sub>					
	MCOR0036C	Butantan	Funed	Coelha	Consenso
1	MNPAHLLVLAAVCVS	2	1	1	4
2	AHLLVLAAVCVSLLG	1	0	1	2
3	LVLAAVCVSLLGASS	1	1	1	3
4	AAVCVSLGASSVPP	1	0	1	2
5	CVSLLGASSVPPRPL	1	1	2	4
6	LLGASSVPPRPLNLI	1	1	1	3
7	ASSVPPRPLNLIQ	1	2	1	4
8	<b>VPPRPLNLIQFORMI</b>	2	2	2	6
9	RPLNLIQFORMIQCT	2	1	1	4
10	<b>NLIQFORMIQCTTRR</b>	2	1	2	5
11	NQFORMIQCTTRRS	1	1	1	3
12	RMQCTTRRS	0	0	0	0
13	QCTTRRS	0	0	0	0
14	TRRS	0	0	0	0
15	SAWTF	0	0	0	0
16	TFTNYG	0	0	0	0
17	NYG	1	0	0	1
18	CYCGAGG	3	0	0	3
19	GAGG	3	1	0	4
20	GS	3	1	1	5
21	TPV	2	0	0	2
22	DEL	0	0	0	0
23	DR	0	0	0	0
24	CK	0	0	0	0
25	HDD	1	1	1	3
26	CY	1	2	2	5
27	AA	1	2	2	5
28	KY	1	2	2	5



29	RCSTKLTLYTSTCSS	1	1	1	3
30	TKLTLYTSTCSSQTV	0	0	0	0
31	TLYTSTCSSQTVSVT	1	1	0	2
32	TSTCSSQTVSVTCKD	1	0	0	1
33	CSSQTVSVTCKDNGT	0	0	0	0
34	QTVSVTCKDNGTKCK	1	1	1	3
35	SVTCKDNGTKCKAFV	1	1	1	3
36	CKDNGTKCKAFVCNC	1	1	1	3
37	NGTKCKAFVCNCDRT	0	0	0	0
38	KCKAFVCNCDRTAAL	0	0	0	0
39	AFVCNCDRTAALCFG	0	0	0	0
40	CNCDRTAALCFGRAP	2	2	2	6
41	DRTAALCFGRAPYNK	2	2	2	6
42	<b>AALCFGRAPYNKNNE</b>	3	3	2	8
43	<b>CFGRAPYNKNENIN</b>	3	3	2	8
44	<b>RAPYNKNENINPNR</b>	3	3	3	9
45	<b>PYNKNENINPNRCR</b>	3	3	3	9

**Tabela 2:** Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0036C (fosfolipase A<sub>2</sub>) frente aos soros utilizados. Uma pontuação de cada spot foi atribuída frente a reatividade de cada soro. As regiões mais reativas encontram-se em negrito.

Toxina					
	MCOR0599C	Butantan	Funed	Coelha	Consenso
1	MKTLLLTIVVVVTIVC	2	2	1	5
2	LLLTLVVVTIVCLDF	2	2	0	4
3	TLVVVTIVCLDFGYT	0	0	0	0
4	VVTIVCLDFGYTIVC	0	1	0	1
5	IVCLDFGYTIVCYKR	1	1	1	3
6	<b>LDFGYTIVCYKRHAS</b>	2	2	1	5
7	GYTIVCYKRHASDSQ	1	1	1	3
8	IVCYKRHASDSQTTT	1	0	0	1
9	YKRHASDSQTTTCLS	0	0	0	0
10	HASDSQTTTCLSGIC	0	0	0	0
11	DSQTTTCLSGICYKK	1	1	1	3
12	<b>TTTCLSGICYKKITR</b>	2	2	1	5
13	CLSGICYKKITRGSS	1	1	1	3
14	GICYKKITRGSSRPE	1	1	1	3
15	YKKITRGSSRPEMGC	1	1	1	3
16	ITRGSSRPEMGCPCP	1	1	0	2
17	GSSRPEMGCPCPQSS	0	0	0	0

18	RPEMGCPCPQSSRGV	1	1	1	3
19	MGCGCPQSSRGVKVD	1	1	1	3
20	<b>GCPQSSRGVKVDCCM</b>	2	1	1	4
21	QSSRGVKVDCCMRDK	1	1	1	3
22	RGVKVDCCMRDKCNG	1	1	1	3

**Tabela 3:** Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0599C frente aos soros utilizados. Uma pontuação de cada spot foi atribuída frente a reatividade de cada soro. As regiões mais reativas encontram-se em negrito.

Toxina					
MCOR0604C					
		Butantan	Funed	Coelha	Consenso
1	MKTLLTLVVVTIMC	2	2	2	6
2	LLTLVVVTIMCLDL	2	2	1	5
3	TLVVVTIMCLDLGYT	0	0	0	0
4	VVTIMCLDLGYTLEC	0	0	0	0
5	IMCLDLGYTLECKIC	0	1	0	1
6	LDLGYTLECKICNFK	1	1	2	4
7	GYTLECKICNFKTCP	2	1	1	4
8	<b>LECKICNFKTCPDE</b>	3	2	0	5
9	<b>KICNFKTCPDELRH</b>	3	2	0	5
10	NFKTCPDELRHCAS	2	1	0	3
11	TCPTDELRHCASGET	0	0	0	0
12	TDELRHCASGETICY	0	0	0	0
13	LRHCASGETICYKTF	1	1	1	3
14	CASGETICYKTFWNT	1	1	1	3
15	GETICYKTFWNTHRG	1	1	1	3
16	ICYKTFWNTHRGLRI	1	1	1	3
17	KTFWNTHRGLRIDRG	1	2	1	4
18	WNTHRGLRIDRGCAA	1	1	1	3
19	HRGLRIDRGCAATCP	1	0	0	1
20	LRIDRGCAATCPTVK	1	1	1	3
21	DRGCAATCPTVKPGV	1	1	1	3
22	<b>CAATCPTVKPGVNI I</b>	3	1	1	5
23	<b>TCPTVKPGVNI ICCK</b>	3	1	2	6
24	TVKPGVNI ICCKTDN	1	0	1	2
25	KPGVNI ICCKTDNCN	2	0	1	3

**Tabela 4:** Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0604C frente aos soros utilizados. Uma pontuação de cada spot foi atribuída frente a reatividade de cada soro. As regiões mais reativas encontram-se em negrito.

Toxina					
MCOR0039C		Butantan	Funed	Coelha	Consenso
1	MNTLLLTIVVVTIVC	2	3	1	6
2	LLLTIVVVTIVCLDF	2	3	1	6
3	TLVVVTIVCLDFGYT	0	0	0	0
4	VVTIVCLDFGYTTKC	1	2	1	4
5	IVCLDFGYTTKCLTK	1	2	2	5
6	LDFGYTTKCLTKFSP	1	1	2	4
7	GYTTKCLTKFSPGLQ	1	1	2	4
8	TKCLTKFSPGLQTSQ	1	1	2	4
9	LTKFSPGLQTSQTCP	1	1	2	4
10	FSPGLQTSQTCPAGQ	0	0	0	0
11	GLQTSQTCPAGQKIC	1	1	1	3
12	TSQTCPAGQKICFKK	1	1	2	4
13	<b>TCPAGQKICFKKWKK</b>	2	2	2	6
14	<b>AGQKICFKKWKKGEK</b>	1	2	2	5
15	KICFKKWKKGEKVSR	1	2	2	5
16	FKKWKKGEKVSARGCA	1	2	2	5
17	WKKGEKVSARGCAVTC	1	1	2	4
18	GEKVSARGCAVTCPKP	1	1	2	4
19	<b>VSRGCAVTCPKPKKD</b>	1	2	2	5
20	<b>GCAVTCPKPKKDETI</b>	1	2	1	4
21	VTCPKPKKDETIQCC	0	2	1	3
22	<b>PKPKKDETIQCCTKN</b>	1	1	1	3
23	<b>KKDETIQCCTKNNCN</b>	1	1	1	3
24	<b>KDETIQCCTKNNCNR</b>	1	1	1	3

**Tabela 5:** Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0039C frente aos soros utilizados. Uma pontuação de cada spot foi atribuída frente a reatividade de cada soro. As regiões mais reativas encontram-se em negrito.

Toxina					
MCOR100C		Butantan	Funed	Coelho	Consenso
1	MKTLLLTIVVVTIMC	3	3	1	7
2	LLLTIVVVTIMCLDL	3	3	1	7
3	TLVVVTIMCLDLGYT	0	0	0	0
4	VVTIMCLDLGYTLVC	2	1	0	3
5	IMCLDLGYTLVCYTN	2	1	0	3
6	LDLGYTLVCYTNVLE	0	0	0	0
7	GYTLVCYTNVLEPPG	1	1	0	2
8	LVCYTNVLEPPGTLE	1	1	0	2

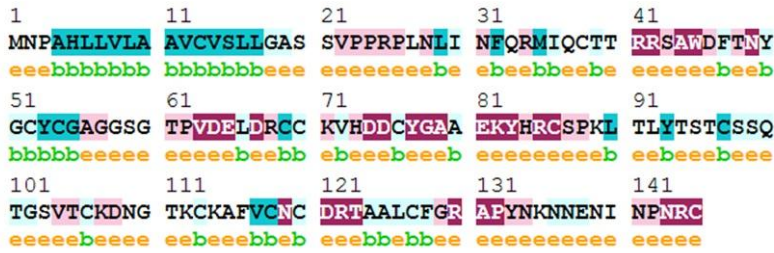
9	YTNVLEPPGTLETCP	1	0	0	1
10	VLEPPGTLETCPDDF	1	0	0	1
11	PPGTLETCPDDFTCV	0	0	0	0
12	TLETCPDDFTCVKKW	1	1	2	4
13	TCPDDFTCVKKWEGG	1	1	0	2
14	<b>DDFTCVKKWEGGRR</b>	2	2	2	6
15	<b>TCVKKWEGGRRVTQ</b>	2	2	2	6
16	<b>KKWEGGRRVTQYCS</b>	2	2	2	6
17	EGGGRRVTQYCSHAC	2	1	1	4
18	<b>GRRVTQYCSHACAI</b>	2	2	3	7
19	VTQYCSHACAI PASY	0	0	1	1
20	YCSHACAI PASYEFV	2	0	1	3
21	HACAI PASYEFVHCC	1	0	0	1
22	AIPASYEFVHCCQTT	1	0	0	1
23	ASYEFVHCCQTTKCN	0	0	0	0
24	SYEFVHCCQTTKCN	1	0	0	1

**Tabela 6:** Análise da reatividade da região da membrana correspondente a Mcor0100C frente aos soros utilizados. Uma pontuação de cada spot foi atribuída frente a reatividade de cada soro. As regiões mais reativas encontram-se em negrito.

#### 4.4 Predição de Imunogenicidade

Com objetivo de prever regiões imunogênicas na sequência linear das neurotoxinas de *M.corallinus*, utilizou-se o software Epitopia. Os resíduos com maior pontuação de imunogenicidade apresentam a cor violeta como observado na Figura 22.

- Mcor0036c (PLA<sub>2</sub>)



- Mcor0599c



- Mcor0604c



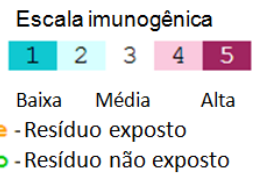
- Mcor0039c



- Mcor0100C



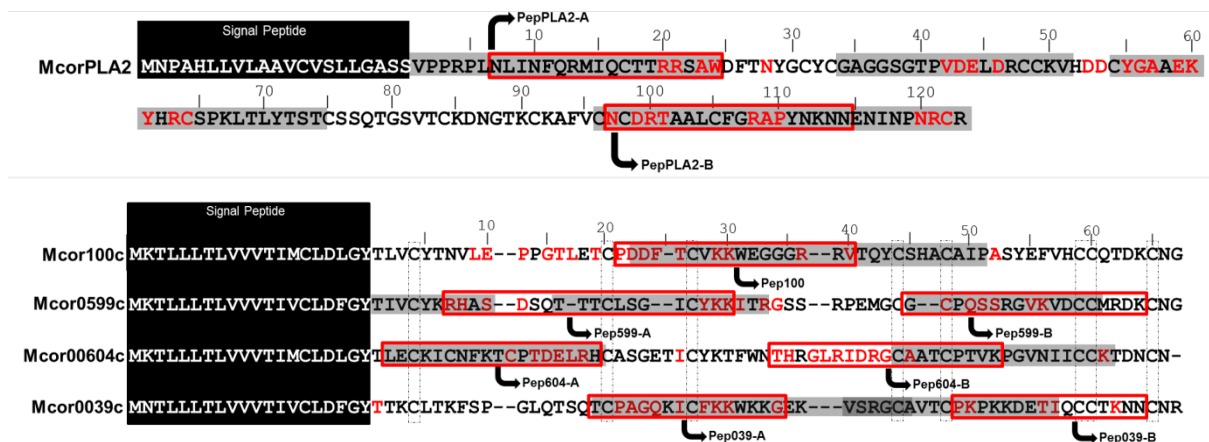
Legenda



**Figura 22:** Análise das sequências das toxinas através do software Epitopia. Os resíduos mais imunogênicos são marcados na cor roxa.

#### 4.5 Escolha das seqüências a serem sintetizadas

Após a análise da reatividade dos soros nos experimentos com membrana de SPOT e das seqüências pelo programa Epitopia, as seqüências de peptídeos foram escolhidas (Figura 23). Para a fosfolipase A<sub>2</sub>, as regiões que apresentaram maior soma de reatividade foram: <sup>28</sup>NLINFQRMIOCTTRRS<sup>45</sup> e <sup>119</sup>NCDRTAALCFGRAPY<sup>137</sup>, e os peptídeos foram chamados PepPLA2a e PepPLA2b, respectivamente. Para a 3FTX Mcor0599c os peptídeos foram escolhidos baseados na região imunogênica encontrada por SPOT e validada programa Epitopia, correspondendo a área N-terminal. As seqüências <sup>28</sup>RHASDSQTTTCLSGICY<sup>45</sup> e <sup>58</sup>GCPQSSRGVKVDCCMRD<sup>75</sup> foram nomeadas Pep0599a e Pep0599b respectivamente. Para a 3FTX correspondente a seqüência Mcor0604c, escolheu-se a seqüência encontrada da região N-terminal <sup>22</sup>LECKICNFKTCPTDEL<sup>39</sup>, que foi nomeada Pep604a. O peptídeo Pep604b <sup>54</sup>THRGLRIDRGCAATCPTVK<sup>72</sup> foi escolhido após o deslocamento de 10 resíduos presentes na seqüência N-terminal que foram selecionados após a técnica de SPOT para uma região rica em resíduos imunogênicos prevista pelo programa Epitopia. Os peptídeos escolhidos para a toxina Mcor0039c foram <sup>37</sup>TCPAGQKICFKK<sup>52</sup> (nomeado Pep039a) e <sup>64</sup>PKPKKDETIQCCT<sup>79</sup> (nomeado Pep039b). Essas seqüências correspondem respectivamente a região N-terminal e a região C-terminal após o deslocamento de 7 resíduos baseado na localização de regiões imunogênicas pelo programa Epitopia. Para a 3FTX Mcor0100c, somente a seqüência <sup>39</sup>PDDFTCVKKWEGGRRV<sup>55</sup> foi escolhida baseado nos critérios de escolha. Este peptídeo foi nomeado Pep0100.

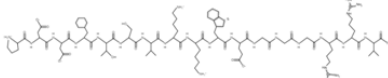
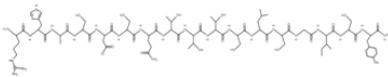
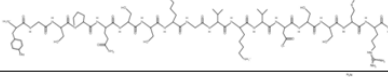
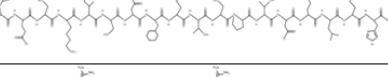
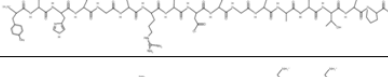
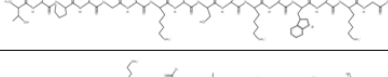
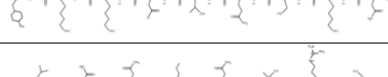
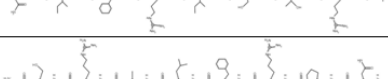



**Figura 23:** Sequências de peptídeos escolhidas correspondentes a cada toxina (Nas caixas vermelhas). Em cinza, as regiões reconhecidas através da técnica de Spot. Em fonte vermelha, os aminoácidos mais imunogênicos

segundo o software Epitopia. As regiões correspondentes ao peptídeo sinal estão identificadas nas caixas pretas. Nota-se, que no caso das 3FTX apesar da diversidade das sequências, é possível o seu alinhamento pelo software ClustalW.

#### 4.6 Propriedades Físico químicas

Para a análise das propriedades físico-químicas das sequências, utilizou-se a ferramenta Peptide Properties Calculator, disponível pela empresa Innovagem. Dos 9 peptídeos escolhidos, 8 apresentaram boa solubilidade em água. Apenas o peptídeo PepPLA2a apresentou alta hidrofobicidade. Todos apresentaram um ponto isoeletrico na faixa básica, como pode ser observado na figura 24.

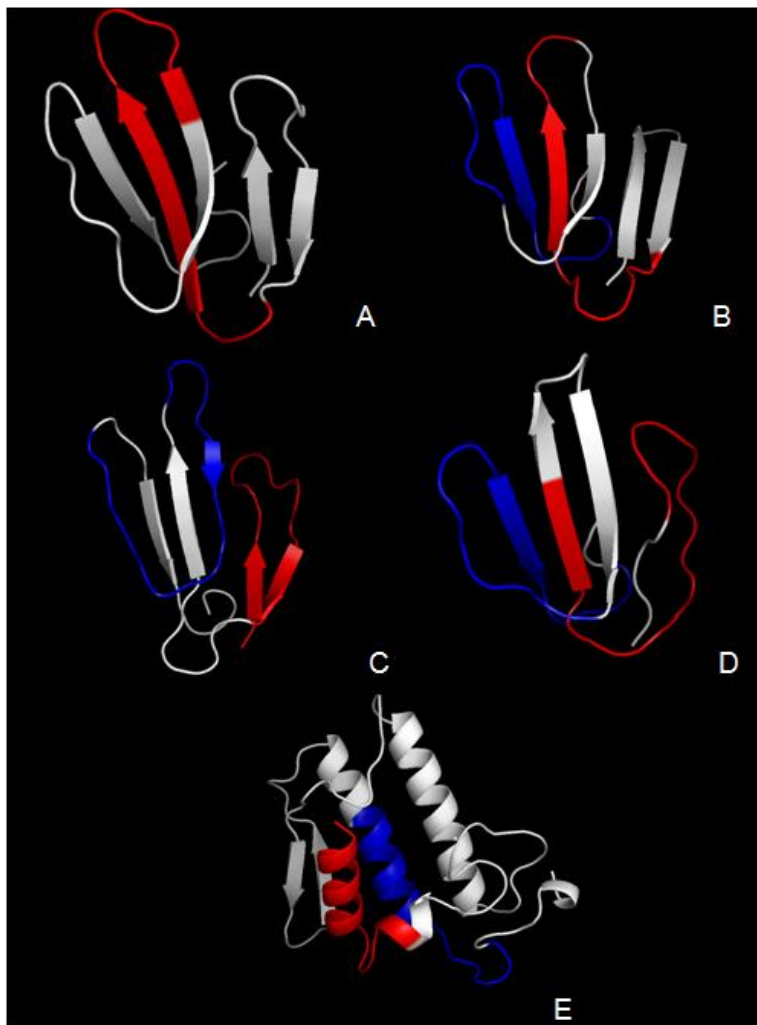
Peptídeo	Sequência	Resíduos (aa)	Massa (kDa)	pI	Carga	Hidrofilicidade	Estrutura
Pep100	PDDFTSVK <b>KK</b> WEGGRRV	17	1932.97	9.93	+1	27.61	
Pep599a	RHASDSQTTTSLSGIS <b>Y</b> KK	19	2066.03	10.12	+2	23.67	
Pep599b	YGS <b>P</b> QSSRGVKVD <b>S</b> SMRDK	19	2083.00	10.12	+2	27.61	
Pep604a	Y <b>L</b> ESKIS <b>N</b> FKT <b>S</b> P <b>T</b> DEL <b>R</b> H	19	2264.14	7.63	0	25.37	
Pep604b	Y <b>T</b> HRGLRIDRGS <b>A</b> AT <b>S</b> P <b>T</b> V <b>K</b>	20	2185.16	11.33	+3	23.67	
Pep039a	T <b>S</b> PAGQKIS <b>F</b> KKW <b>K</b> KG	16	1790.01	11.17	+5	21.86	
Pep039b	Y <b>P</b> KPKKDETIQ <b>S</b> STK <b>N</b> N	17	1977.01	9.86	+2	28.71	
PepPLA2a	N <b>L</b> IN <b>F</b> Q <b>R</b> MIQ <b>S</b> TT <b>R</b> RS <b>A</b> W	18	2221.15	12.79	+3	10.53	
PepPLA2b	N <b>S</b> DR <b>T</b> A <b>A</b> LS <b>F</b> GR <b>A</b> PY <b>N</b> K <b>N</b> N	19	2095.01	10.32	+2	21.65	

**Figura 24:** Propriedades físico químicas dos peptídeos escolhidos dentre as toxinas de *M.corallinus*.

## 4.7 Modelagem molecular

Uma vez que as estruturas tridimensionais das toxinas estudadas não foram ainda resolvidas, modelos foram obtidos por modelagem por homologia. As coordenadas atômicas da Bucáína (PDB ID 2H8UA, Murakami, M.T.; Kini R.M.; Arni, R.K.) de *Bungarus candidus*, obtida por cristalografia de raio X, foi utilizada para a modelagem das 3FTX e para o modelo da PLA2 a estrutura da PLA2 ácida de *Ophiophagus hannah* (PDB ID 1gp7, Zhang, H *et al.* 2002) foi usada.

Após a escolha de cada sequência peptídica, realizou-se a localização de cada uma delas nos modelos 3D baseados em homologia (Figura 25).



**Figura 25:** Estruturas 3D das proteínas estudadas com os respectivos peptídeos marcados. (A)Mcor0100c, com PepTx 100; (B) Mcor0039c, com peptídeo Pep0039a em vermelho e Pep0039b em azul ; (C)Mcor0604c, com



peptídeo Pep0604a em vermelho e Pep0604b em azul; (D) Mcor0599c com peptídeo Pep0599a em vermelho e Pep0599b em azul; (E) Mcor0036c com PepPla<sub>2</sub>a em vermelho e PepPla<sub>2</sub>b.

## 4.8 Síntese de peptídeos sintéticos

Baseado nos resultados obtidos após a realização da detecção em membrana de SPOT, os peptídeos foram sintetizados pelo aparelho ResPep SL. Todas as cisteínas presentes nas sequências foram substituídas por serinas, e uma tirosina foi adicionada nas sequências que não possuíam aminoácidos aromáticos (Figura 26). Após a síntese, os peptídeos foram liofilizados.

<ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfolipase A<sub>2</sub>  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">NLINFORMIQCTTRRS<del>AW</del></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">NCDRTAALCFGRAPYNKNN</div> </div> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfolipase A<sub>2</sub>  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">NLINFORMIQCTTRRS<del>AW</del></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N<del>S</del>DRTAAL<del>S</del>FGRAPYNKNN</div> </div> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0599c (3FTx)  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RHASDSQTTTCLSGICYK</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GCPQSSRGVKVDCMRDK</div> </div> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0599c (3FTx)  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RHASDSQTTT<del>S</del>LSGI<del>S</del>YK</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><del>Y</del>G<del>S</del>PQSSRGVKVD<del>S</del>SMRDK</div> </div> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0604c (3FTx)  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LECKICNFKTCPTDEL<del>RH</del></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">THRGLRIDRGCAATCPTVK</div> </div> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0604c (3FTx)  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><del>Y</del>LE<del>S</del>KI<del>S</del>NFKT<del>S</del>PTDEL<del>RH</del></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><del>Y</del>THRGLRIDRG<del>S</del>AAT<del>S</del>PTVK</div> </div> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0039c (3FTx)  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">TCPAGQKICFKKWKKG</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PKPKKDETIQCCTKNN</div> </div> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0039c (3FTx)  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><del>T</del><del>S</del>PAGQKISFKKWKKG</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><del>Y</del>PKPKKDETIQ<del>S</del>S<del>S</del>TKNN</div> </div> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0100c (3FTx)  <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PDDFTCVKKWEGGRRV</div> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mcor0100c (3FTx)  <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PDDFT<del>S</del>VKKWEGGRRV</div> </li> </ul>

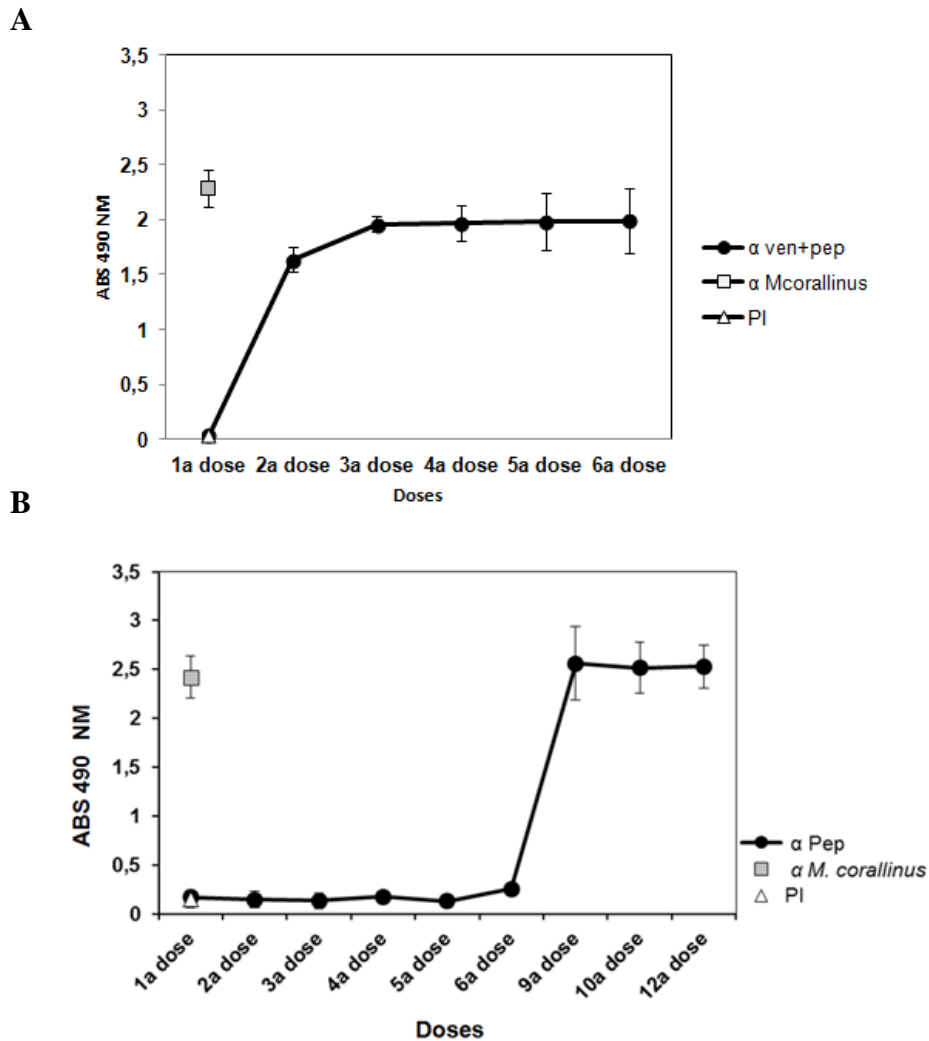
**Figura 26:** Modificações realizadas nas sequências de peptídeos para sua síntese química. Em laranja as sequências antes das modificações, e em verde, após as alterações de sequência mencionadas.

## 4.9 Testes de ELISA

### 4.9.1 Soros/IgGs frente ao veneno de *Micrurus sp.*

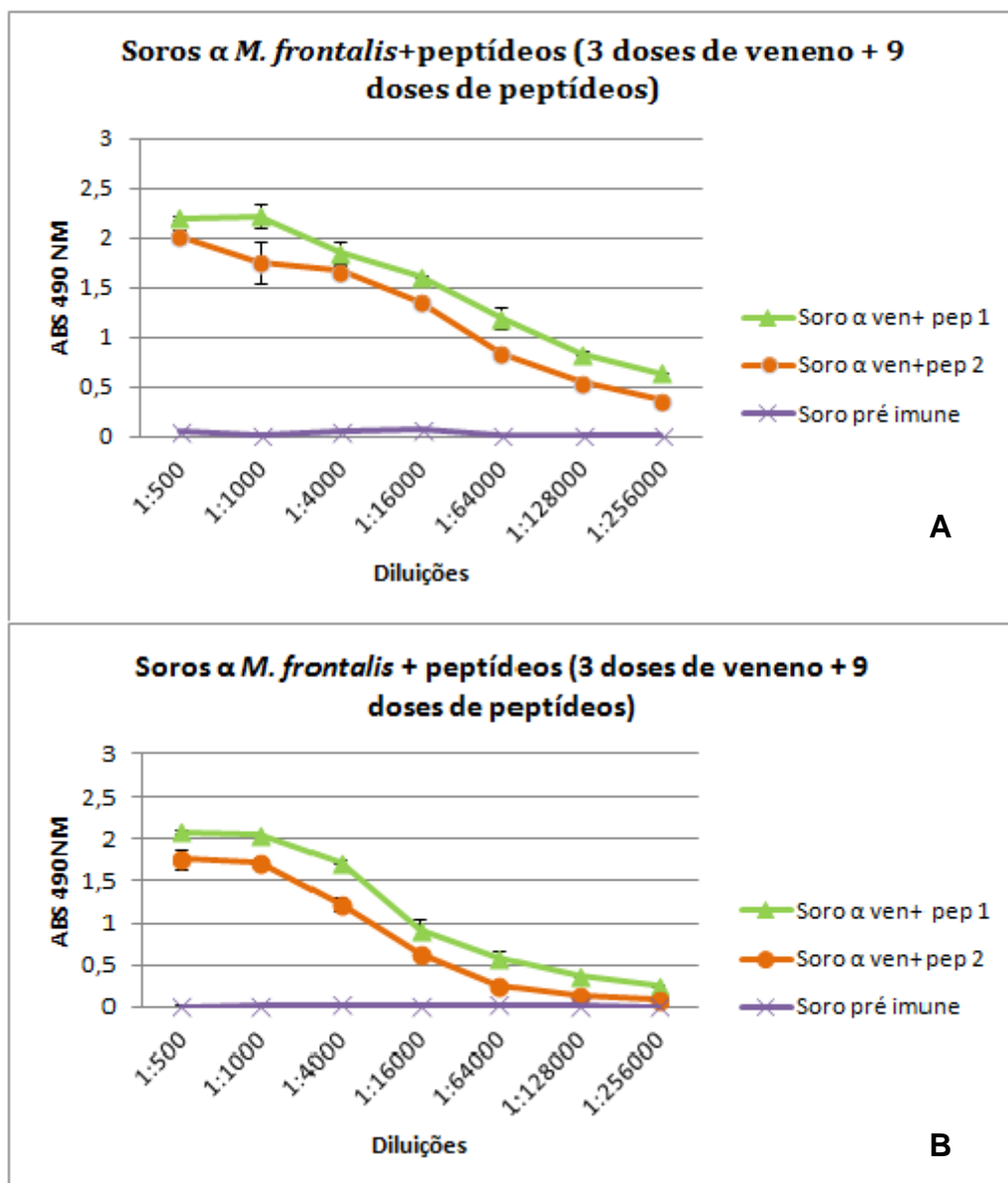
Primeiramente analisou-se a reatividade do soro dos animais imunizados frente ao veneno de *M. corallinus*, após diferentes doses de imunização. A diluição utilizada foi 1:500, e o experimento foi realizado com um pool do soro dos dois coelhos de cada grupo. Os animais imunizados com veneno de *M. frontalis* e peptídeos (denominados  $\alpha$  ven+pep) começaram a

apresentar um reconhecimento do veneno após a segunda dose de imunizações (Figura 27-A). Como o soro dos animais imunizados com peptídeos sintéticos (nomeados  $\alpha$  Pep) não foi capaz de reconhecer o veneno bruto até a sexta dose do primeiro ciclo, utilizou-se também o soro produzido após a 9ª, 10ª e 12ª doses de imunização (Figura 27-B)



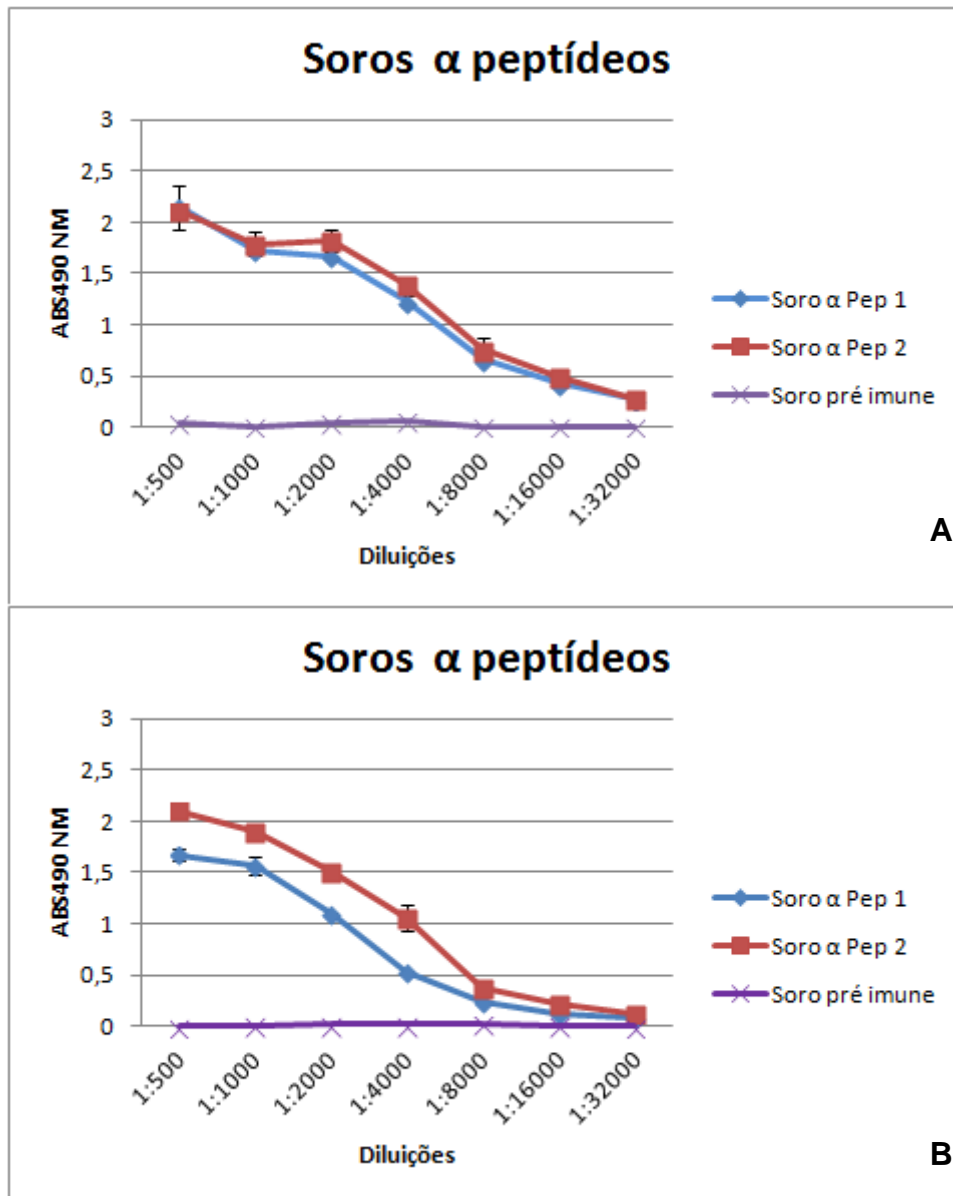
**Figura 27:** Reatividade do pool soros dos animais imunizados frente ao veneno de *M.corallinus*, após diversas doses de imunização. Animais imunizados com veneno e peptídeos (A) e imunizados com peptídeos (B).

Para analisar a reatividade individual do soro de cada animal imunizados com veneno de *M.frontalis* e peptídeos de *M.corallinus* (nomeados soro  $\alpha$  ven+ pep 1, para o coelho 1, e 2 para o coelho 2) testes de ELISA foram realizados. Após a sexta dose do segundo ciclo de imunizações, notou-se um alto reconhecimento dos venenos de *M. frontalis* e *M.corallinus*, por ambos os coelhos, como observado na figura 28:



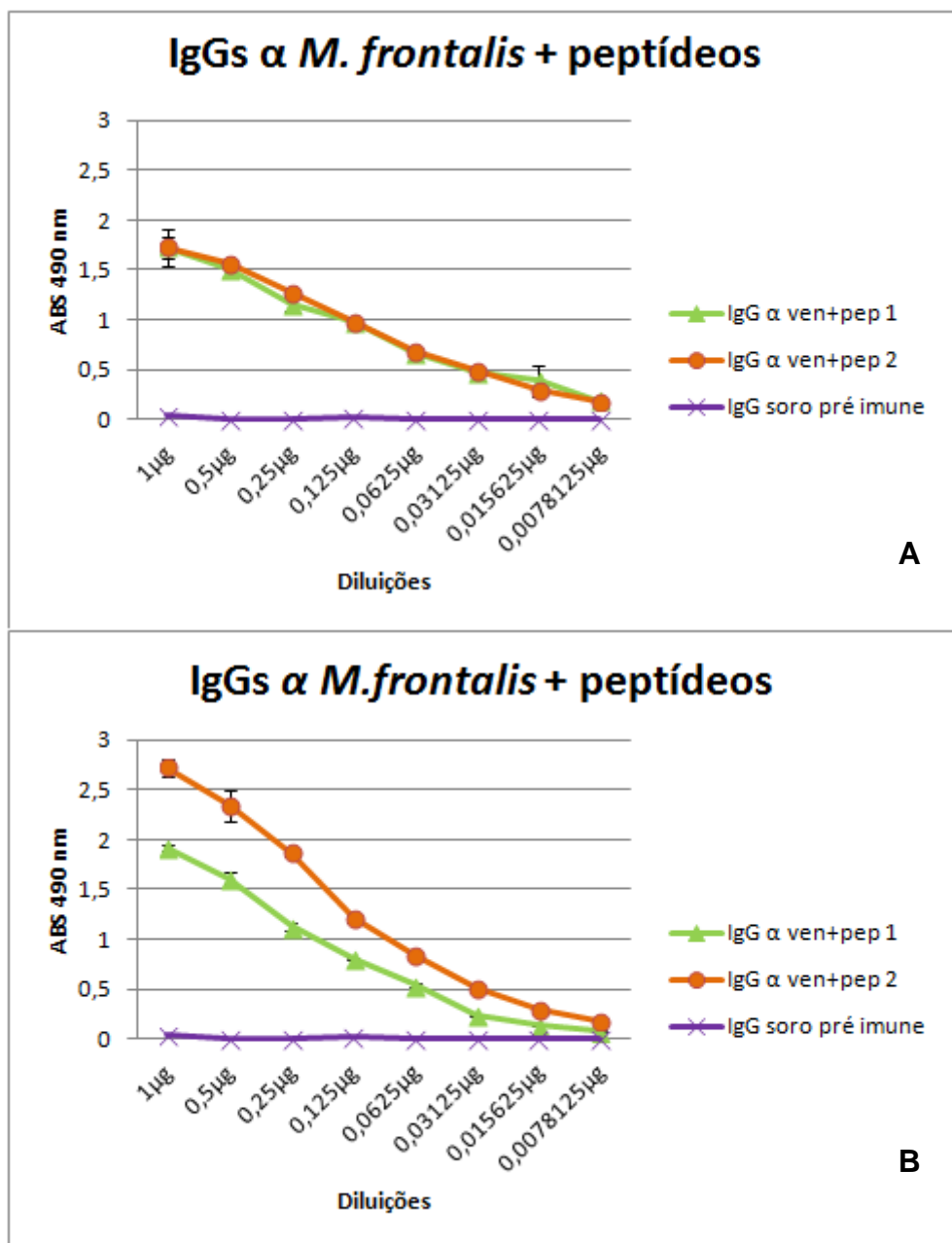
**Figura 28:** Reatividade dos soros dos animais imunizados com veneno de *M. frontalis* e peptídeos sintéticos frente a veneno de (A) *M. frontalis* e veneno de (B) *M. corallinus*. Soro correspondente à última dose do segundo ciclo de imunizações.

A mesma análise foi feita com o soro dos animais que foram imunizados apenas com peptídeos sintéticos de *M. corallinus* (nomeados soro  $\alpha$  Pep 1, para o coelho 1, e 2, para o coelho 2) como demonstrado na figura 29.



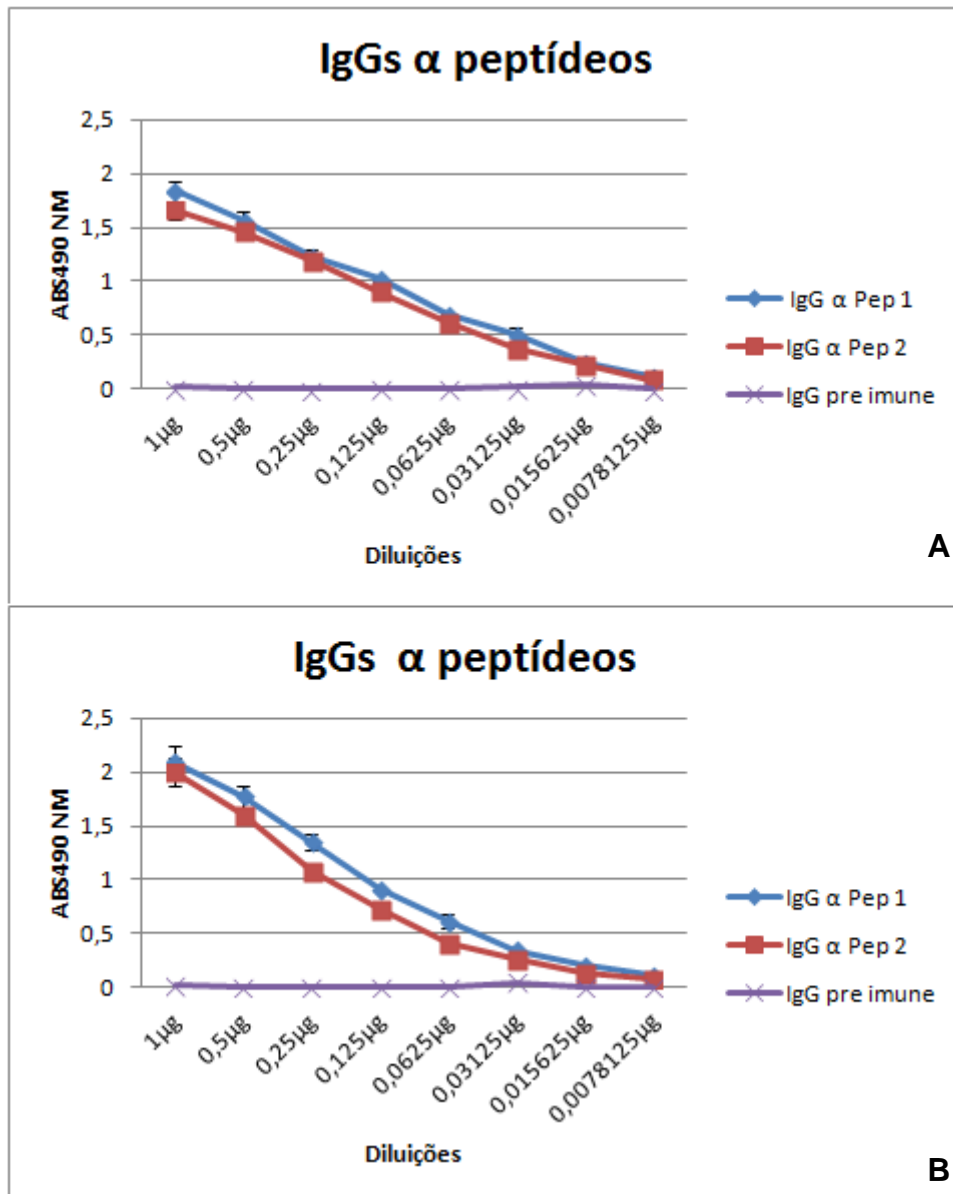
**Figura 29:** Reatividade dos soros dos animais imunizados com peptídeos de *M.corallinus* frente ao veneno de (A) *M.frontalis* e (B) *M.corallinus*. Soro correspondente à última dose do segundo ciclo de imunizações.

Após a purificação das IgGs dos soros dos coelhos imunizados correspondente a última dose do segundo ciclo, novos testes foram realizados. As imunoglobulinas dos coelhos imunizados com veneno e peptídeos (nomeadas IgG α ven+pep 1 e 2) foram capazes de reconhecer os venenos de *M.frontalis* e *M.corallinus*, apresentando maior reatividade frente ao veneno de *M.corallinus* como demonstrado na figura 30.



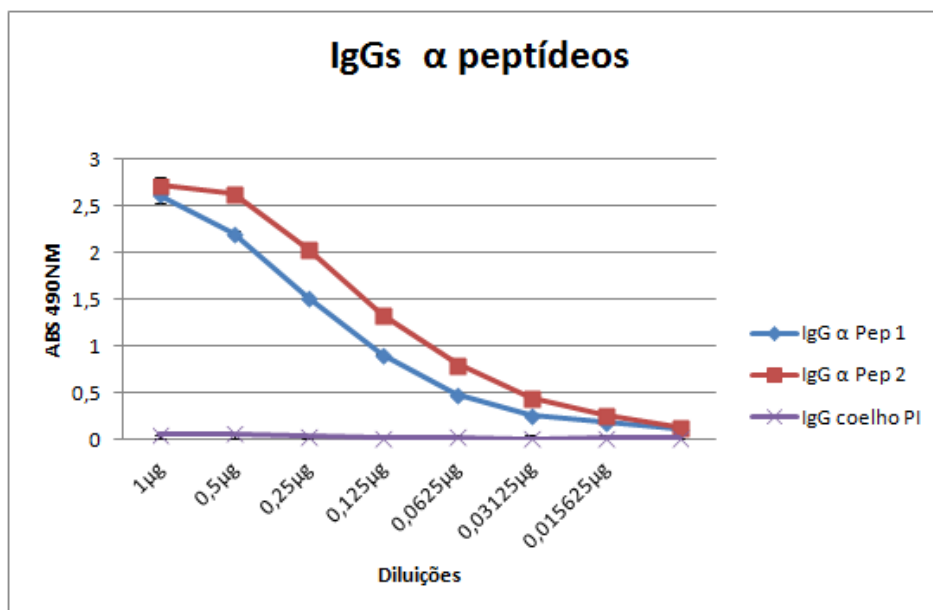
**Figura 30:** Reatividade das imunoglobulinas dos animais imunizados com veneno de *M. frontalis* e peptídeos sintéticos frente ao veneno de (A) *M. frontalis* e (B) *M. corallinus*.

As imunoglobulinas dos animais imunizados com peptídeos sintéticos (nomeadas IgG α Pep 1 e 2) também foram testadas frente ao veneno de *M. frontalis* e *M. corallinus*. A reatividade das IgGs foi maior frente ao veneno de *M. corallinus*, como observado na figura 31.



**Figura 31:** Reatividade das IgGs dos animais imunizados com peptídeos de *M.corallinus* frente ao veneno de (A)*M.frontalis* e (B)*M.corallinus*.

Além disso, testou-se se as imunoglobulinas anti-peptídeos demonstraram eram capazes de reconhecer também o veneno de *M.leminiscatus*, como observado na figura 32.

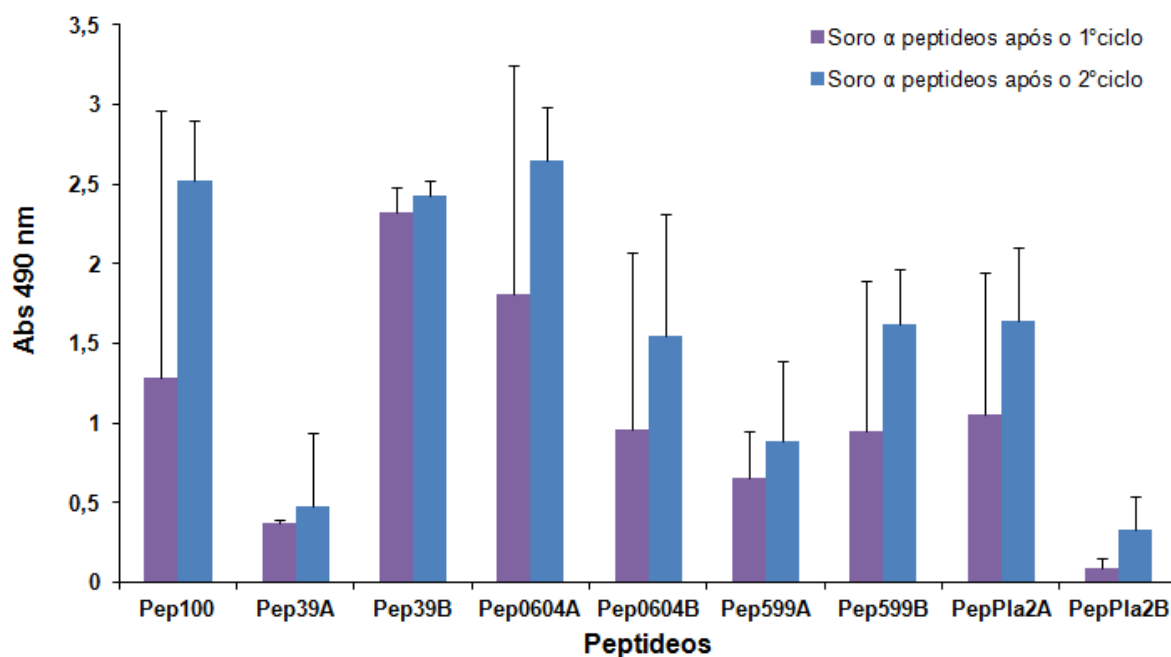


**Figura 32:** Reatividade das IgGs dos animais imunizados com peptídeos de *M.corallinus* frente ao veneno de *M.leminiscatus*.

#### 4.9.2 Soros anti peptídeo frente aos peptídeos sintéticos

Para avaliar o reconhecimento do soro dos animais imunizados com peptídeos sintéticos frente a cada peptídeo, realizou-se um teste de ELISA onde os nove peptídeos foram conjugados com glutaraldeído 1% e utilizados para a sensibilização de microplacas.

A reatividade do soro dos animais correspondente à última dose do primeiro ciclo e a última dose do segundo ciclo foi avaliada. Uma média da reatividade dos dois coelhos foi calculada (Figura 33). Apesar de cada animal responder de maneira diferente a cada imunógeno, notou-se que de maneira geral, houve um reconhecimento maior dos peptídeos após o segundo ciclo de imunizações.



**Figura 33:** Reatividade dos soros  $\alpha$  peptídeos frente a cada peptídeo após o fim do primeiro ciclo (em roxo) e o fim do segundo ciclo (em azul). Os dados representam a média da reatividade dos dois coelhos após cada ciclo.

#### 4.10 Atividade fosfolipásica

Para analisar a atividade fosfolipásica do veneno de *M. frontalis* e *M. corallinus*, o ensaio de determinação de ação hemolítica foi realizado. Neste experimento, procurou-se estabelecer a dose fosfolipásica mínima (MPD), ou seja, a dose de veneno capaz de induzir a formação de um halo de 10 mm de diâmetro em uma tampa de placa de ELISA contendo 25 ml de agarose 0,8% , 350  $\mu$ L de hemáceas, 300  $\mu$ L de gema de ovo como fonte de lecitina e 250 $\mu$ L de cloreto de cálcio.

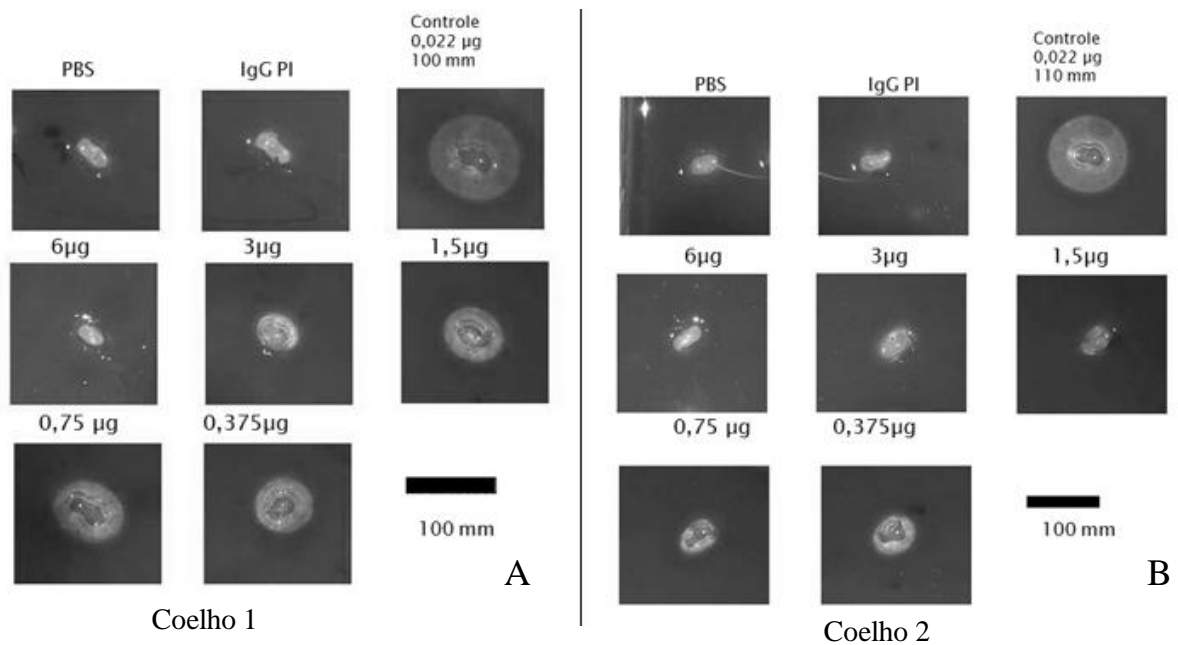
A MPD do veneno de *M. frontalis* foi de 0,022 $\mu$ g de veneno e a MPD de *M. corallinus* foi 1,84 $\mu$ g de veneno.



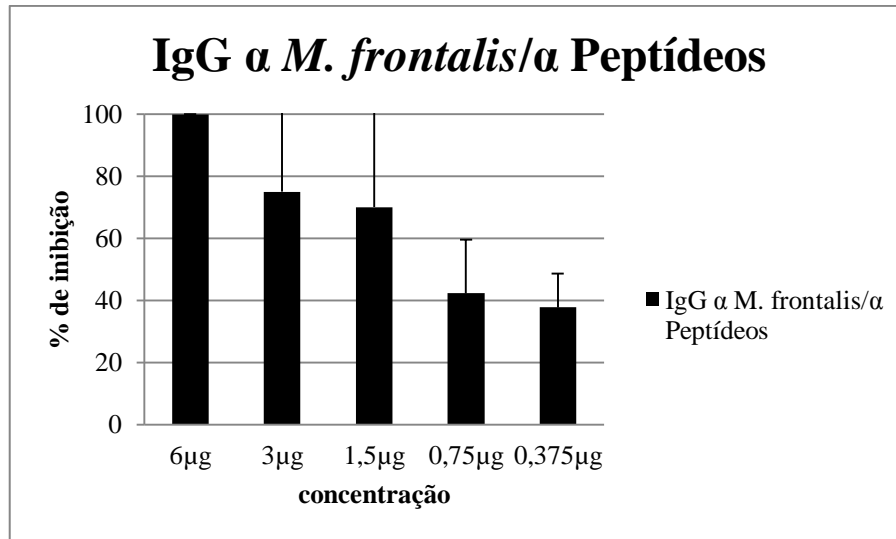
#### 4.10.1 Neutralização da atividade fosfolipásica

Para avaliar a capacidade das imunoglobulinas dos animais imunizados em neutralizar a atividade fosfolipásica, diferentes concentrações de imunoglobulinas foram incubadas com uma MPD de cada veneno.

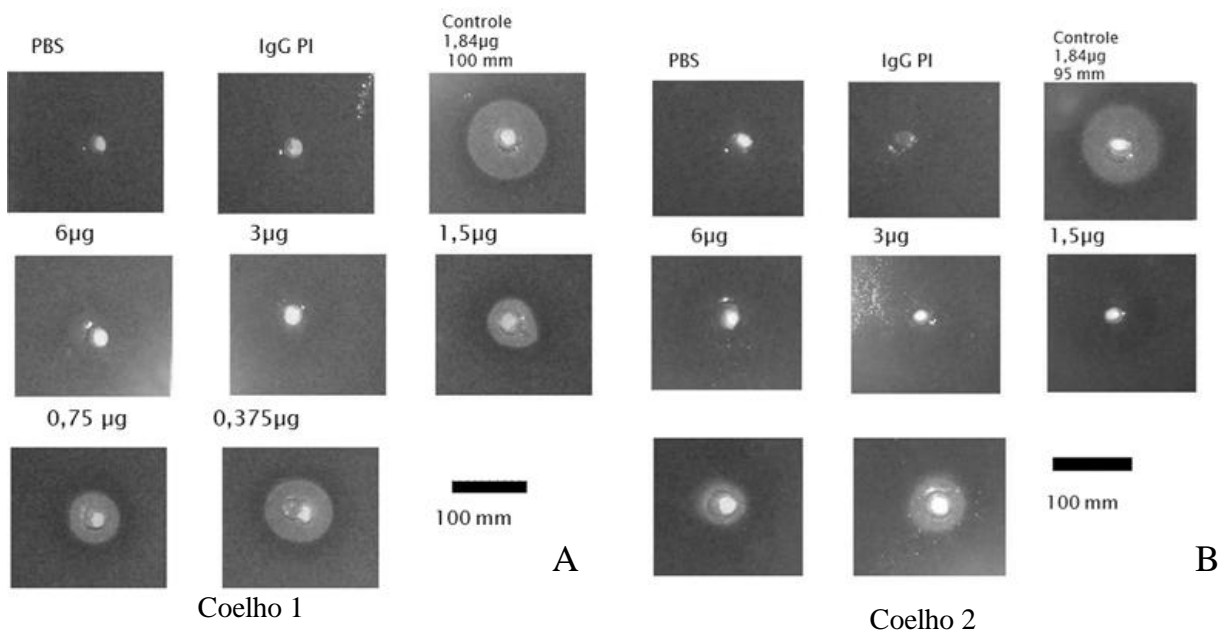
O soro dos animais imunizados com veneno de *M.frontalis* +peptídeos sintéticos foi capaz de neutralizar a MPD de ambos os venenos, como observado nas figuras 34 à 37. Uma média da capacidade de neutralização do soro dos dois animais foi mensurada, como representado na figura 34.



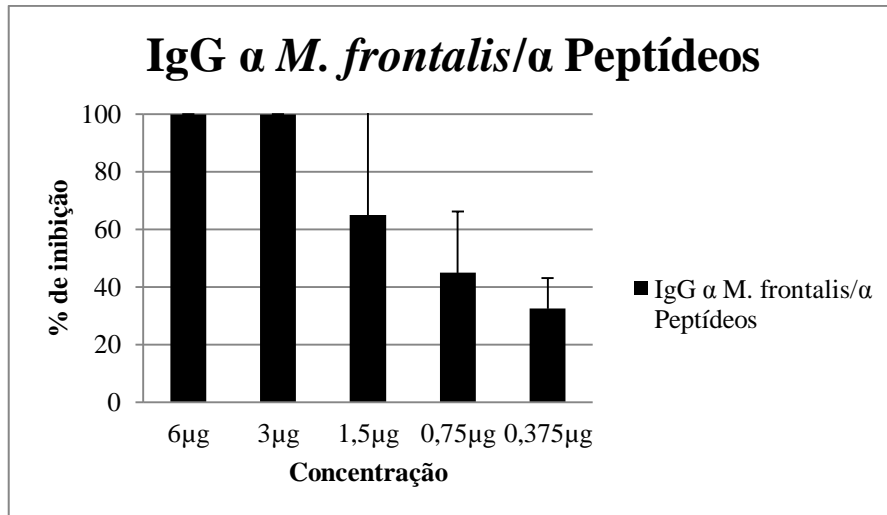
**Figura 34:** Neutralização da atividade fosfolipásica de *M.frontalis* pelas IgGs  $\alpha$  *M.frontalis* e Peptídeos do coelho 1(A) e 2(B)



**Figura 35:** Média da neutralização da atividade fosfolipásica de *M. frontalis* pelas IgGs  $\alpha$  *M. frontalis* e Peptídeos.

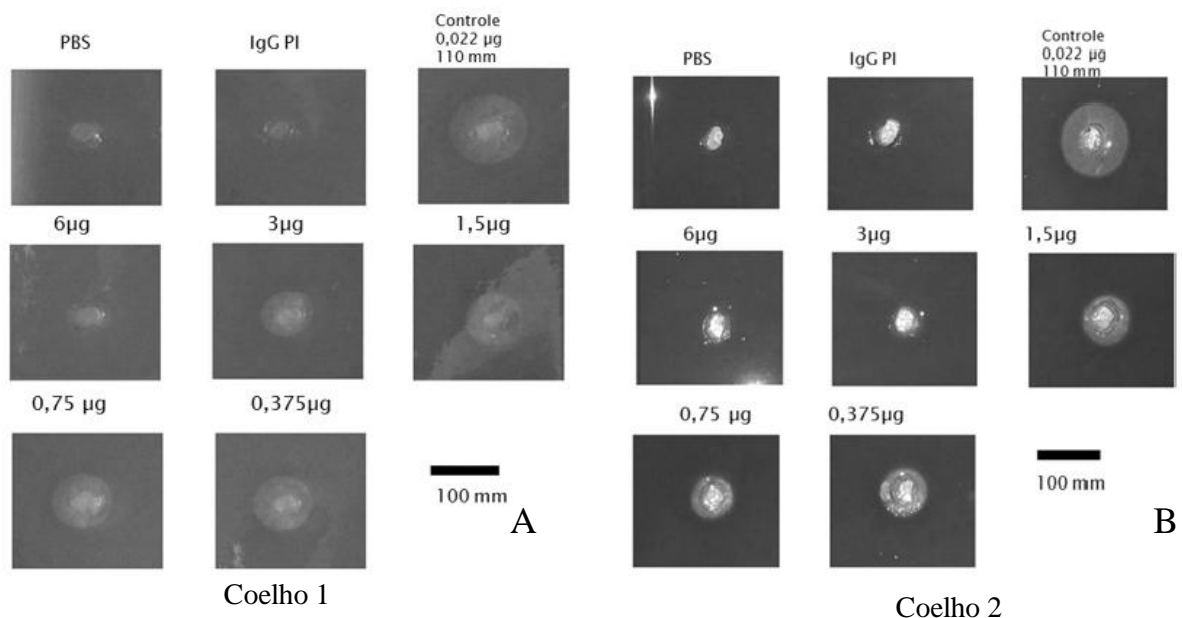


**Figura 36:** Neutralização da atividade fosfolipásica de *M. corallinus* pelas IgGs  $\alpha$  *M. frontalis* e Peptídeos do coelho 1(A) e 2(B)

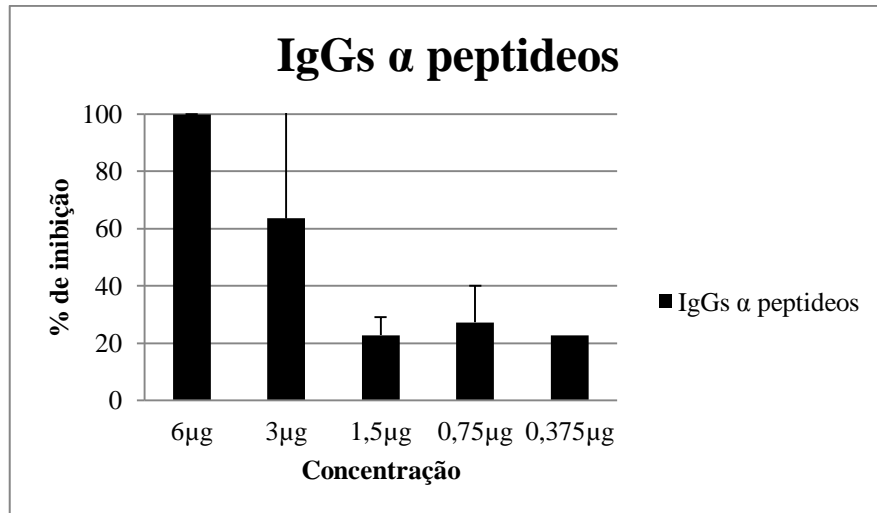


**Figura 37:** Média da neutralização da atividade fosfolipásica de *M. corallinus* pelas IgGs α *M. frontalis* e Peptídeos.

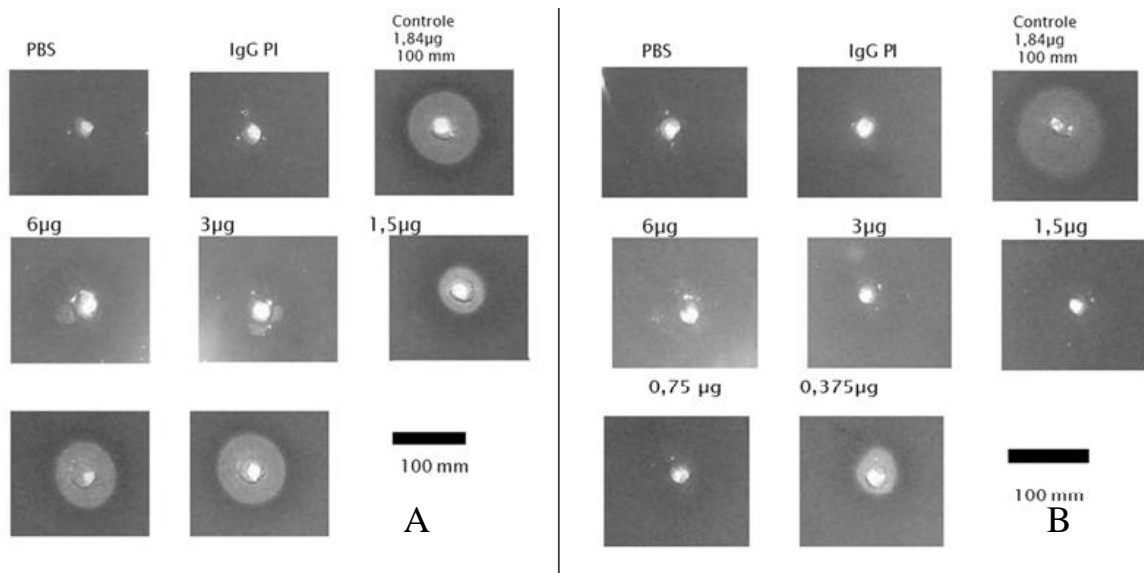
O soro dos animais imunizados com peptídeos sintéticos também demonstrou capacidade de neutralizar a atividade fosfolipásica de ambos os venenos, como demonstrado nas figuras 38 à 41:



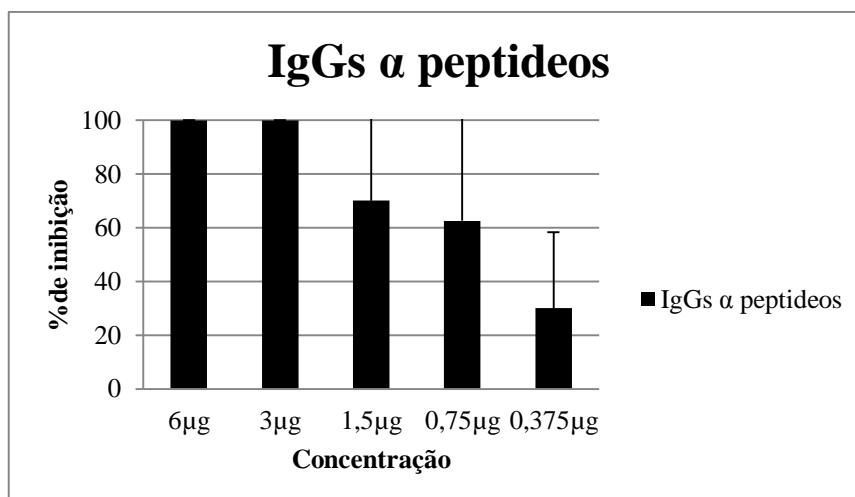
**Figura 38:** Neutralização da atividade fosfolipásica de *M. frontalis* pelas IgGs α peptídeos do coelho 1(A) e 2(B)



**Figura 39:** Média da neutralização da atividade fosfolipásica de *M.frontalis* pelas IgGs α peptideos



**Figura 40:** Neutralização da atividade fosfolipásica de *M.corallinus* pelas IgGs α peptideos do coelho 1(A) e 2(B)



**Figura 41:** Média da neutralização da atividade fosfolipásica de *M. corallinus* pelas IgGs α peptideos.

#### 4.11 Neutralização da atividade letal

Para verificar a capacidade do soro dos animais de neutralizar a atividade letal de *M. corallinus* e *M. frontalis*, realizou-se um teste de neutralização da DL<sub>50</sub>. Uma quantidade equivalente a 1,5 DL<sub>50</sub> do veneno de *M. corallinus* ou de *M. frontalis* foi pré-incubada com 100 µL do pool do soro dos animais de cada grupo em PBS BSA 0,1%.

Como demonstrado na tabela 7, os animais imunizados com veneno de *M. frontalis* e peptideos foram capazes de neutralizar 100% da atividade letal do veneno de *M. corallinus*. Os animais imunizados com peptideos foram capazes de neutralizar 50% da ação letal.

Grupo	Animais sobreviventes	% de sobrevivência
Soro α <i>M. frontalis</i> / α peptideos	4/4	100%
Soro α peptideos	2/4	50%
Soro FUNED (C+)	4/4	100%
PBS (C-)	0/4	0%

**Tabela 7:** Soroneutralização do veneno de *M. corallinus*

Frente ao veneno de *M. frontalis*, tanto o soro dos animais imunizados com veneno e peptideos sintéticos, quanto dos animais imunizados apenas com peptideo foi capaz de neutralizar 50% da dose letal, como observado na tabela 8.

<b>Grupo</b>	<b>Animais sobreviventes</b>	<b>% de sobrevivência</b>
Soro $\alpha$ <i>M.frontalis</i> / $\alpha$ peptídeos	2/4	50%
Soro $\alpha$ peptídeos	2/4	50%
Soro FUNED (C+)	4/4	100%
PBS (C-)	0/4	0%

**Tabela 8:** Soroneutralização do veneno de *M.frontalis*.

## 5 DISCUSSÃO

Até o início da década de 1980, os dados epidemiológicos sobre os acidentes causados por animais peçonhentos eram provenientes de levantamentos pontuais e baseados em casos relatados de atendimentos, principalmente na Região Sudeste Brasileira. A crise na produção de soro eclodiu em 1983, quando a indústria privada desativou a área de produção de imunobiológicos e os laboratórios nacionais não possuíam tecnologias operacionais para atender a demanda nacional. A crise começou a ser contornada após a instalação do Programa Nacional de Ofidismo, quando o Ministério da Saúde começou a distribuição de soros às Secretarias Estaduais de Saúde e os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação obrigatória no país. (Cardoso & Wen, 2010).

O gênero *Micrurus* é o mais diverso gênero de Elapídeos presente nas Américas, possuindo uma distribuição ampla, do sul dos Estados Unidos até a Argentina. Os envenenamentos são relativamente raros devido aos hábitos semifossoriais e comportamento não agressivo da maioria das espécies. Apesar da baixa incidência, os acidentes causados por serpentes corais devem ser considerados graves. (Silva Júnior & Bucarechi, 2010). Dados do Ministério da Saúde demonstram que 50% dos casos de envenenamento por serpentes do gênero *Micrurus* datados dos anos 2007-2012 foram considerados moderados ou graves (Ministério da Saúde, 2014).

Os sintomas de envenenamento por *Micrurus* são resultado de um progressivo bloqueio neuromuscular na placa terminal e em casos severos a morte é causada por parada respiratória. Os venenos de *Micrurus* contem majoritariamente neurotoxinas de baixa massa molecular do tipo toxinas de Três Dígitos (3FTX) além de abundantes fosfolipases A<sub>2</sub>. Além

de cuidados clínicos, a soroterapia com antivenenos é o único tratamento disponível para a picada de corais. (Cecchini *et al.*, 2005; Urdaneta; Bolaños; Gutierréz, 2004).

Estudos bioquímicos com os venenos de *Micrurus* são escassos devido à dificuldade de identificação das espécies, de extração do veneno e da manutenção dos animais em cativeiro (Aird; da Silva, 1991; Tanaka *et al.*, 2010). A escassez de veneno também reflete negativamente na produção de soro antielapídico, embora todo o caso de envenenamento sempre ser considerado como acidente potencialmente grave, segundo o Ministério da Saúde. (2014).

Devido aos problemas na produção de soro Antielapídico e da dificuldade na obtenção de veneno, este trabalho teve como objetivo central a busca de uma alternativa na produção de soro antielapídico, através do estudo de suas principais neurotoxinas. Vale salientar que a dificuldade de obtenção do veneno da serpente *M.corallinus* foi um desafio até mesmo para a conclusão deste trabalho.

Para uma análise do perfil proteico dos venenos estudados, utilizou-se a técnica de SDS-PAGE. A eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou o padrão esperado de bandas nos venenos de algumas espécies do gênero *Micrurus*. Os experimentos mostraram que os venenos *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M.leminiscatus* possuem um perfil que se difere em composição, número e densidade das bandas. Foi possível verificar bandas principalmente na faixa inferior a 70 kDa o que também foi observado por Tanaka e colaboradores (2010). É notável a presença de proteínas de baixo peso molecular no veneno de todas as serpentes estudadas. Sabe-se que as neurotoxinas pré- sinápticas possuem um baixo peso molecular, e que são rapidamente absorvidas e difundidas pelos tecidos, o que explica a precocidade dos sintomas do envenenamento (Pinho & Pereira, 2001).

Tendo como base o trabalho elaborado por Leão e colaboradores (2009), a técnica de SPOT foi utilizada para a síntese de pentadecapeptídeos sobrepostos por três resíduos cobrindo toda a sequência linear das 3FTX de *M.corallinus* MCOR100C, MCOR0039C, MCOR0064C e da fosfolipase A<sub>2</sub> MCOR0036C. O mapeamento e análise de epitopos foram realizados utilizando esta membrana testada frente de diferentes anticorpos, provenientes de duas espécies diferentes: cavalos e coelhos. A técnica mostrou-se eficiente, e os soros reconheceram regiões próximas na membrana, porém com diferentes intensidades de reação.

A reatividade dos soros contra os peptídeos correspondentes a sequência MCOR0100C indicaram uma região imunodominante na região do peptídeo sinal e no centro da proteína. O mesmo padrão foi observado nas sequências de MCOR0039C e MCOR0599C.

A reatividade dos soros frente à toxina correspondente a MCOR064C demonstrou uma região imunorreativa na região do peptídeo sinal e na região C-terminal da proteína. A reatividade com os peptídeos provenientes da PLA<sub>2</sub> (MCOR0036C) indicou uma região imunodominante no peptídeo sinal e na região C-terminal.

As regiões correspondentes ao peptídeo sinal foram reativas em todas as toxinas. Os peptídeos sinais são encontrados nas proteínas que tem como alvo o retículo endoplasmático e eventualmente são destinados a serem secretados no meio extracelular ou periplasma, retidos no lúmen do retículo endoplasmático, ou de qualquer outra organela presente nas vias secretórias. As sequências sinais são geralmente removidas na proteína madura (The Uniprot Consortium, 2013). Apesar do alto reconhecimento das sequências sinais, devido ausência dessas sequências na proteína madura e sua baixa solubilidade em água, optou-se pela escolha de outras regiões como candidatos antigênicos a produção de soro.

As sequências das quatro toxinas também foram analisadas pelo software Epitopia. Este programa pode ser utilizado para detectar regiões imunogênicas em uma dada sequência. Os dados são avaliados baseados em características físico químicas e a propriedades geométricas. Cada resíduo da sequência da proteína recebe uma pontuação que reflete seu potencial imunogênico. O software, através de diferentes cores-códigos, fornece ao usuário uma imagem da natureza imunogênica da sequência estudada com as respectivas pontuações de imunogenicidade (Rubinstein *et al.*, 2009).

Após a análise dos resultados obtidos na técnica de SPOT, e pela avaliação da análise obtida pelo programa Epitopia, nove sequências foram escolhidas. Suas propriedades físico-químicas foram analisadas através do software disponível pela empresa Innovagen (2014), Peptide Properties Calculator. A obtenção de proteínas solúveis é um fator determinante em muitos estudos experimentais. A solubilidade de uma proteína depende de sua sequência de aminoácidos, que são analisados em estudos biofísicos que visam prever a solubilidade de determinada sequência. Uma estratégia é focar em sequências que tem maior chance de solubilidade (Smialowski *et al.*, 2007) o que foi um dos objetivos na realização desta análise. Com exceção da sequência NLINFQRFMIQSTTRRS AW e das sequências correspondentes aos peptídeos sinais (que também foram analisados) todos os peptídeos propostos mostraram boa solubilidade em água.

Com o objetivo de verificar a localização dos epitopos selecionados, os peptídeos correspondentes foram marcados em estruturas tridimensionais baseado em uma modelagem por homologia, através da utilização do programa Swiss Prot. Para as toxinas de 3FTX, a



Bucandina, (PDB ID 2H8UA), isolada da serpente *Bungarus candidus* mostrou-se ser a toxina mais semelhante às 3FTX de *M.corallinus*. Os peptídeos propostos localizaram-se principalmente nas regiões dos loops presentes da toxina. O reconhecimento dos receptores de mamíferos geralmente acontece nas regiões de loop (Sunagar et al., 2013), portanto a escolha de peptídeos presentes nessa região pode ser uma vantagem para a produção de anticorpos. Os anticorpos produzidos poderiam ligar-se a estas regiões, explicando as propriedades de neutralização observadas.

A fosfolipase A<sub>2</sub> mostrou-se semelhante à toxina fosfolipase A<sub>2</sub> de *Ophiophagus Hannah* (PDB ID 1Gp7). Nesta proteína foi encontrado o primeiro loop pancreático em serpentes (Zhang et al., 2002). O loop pancreático é uma extensão de cinco resíduos de aminoácidos, característico de enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> de mamíferos. (Doley et al., 2010). As fosfolipasas são classificadas como IA ou IB, baseado na presença ou ausência do loop pancreático respectivamente. Apesar do grupo IB ser majoritariamente composto de mamíferos, também já foi reportado em alguns venenos de serpentes, inclusive do gênero *Micrurus* (Doley et al., 2010).

A localização dos peptídeos escolhidos representantes das regiões epitópicas localizada nas estruturas 3D demonstrou que todos eles de fato encontram-se expostos na superfície da molécula e portanto acessíveis à ligação de anticorpos.

De acordo com os resultados obtidos pela análise das sequências, os nove peptídeos foram confirmados, e nomeados Pep604 A e B (correspondentes a sequência LECKICNFKTCPTDELRH e THRGLRIDRGCAATCPTVK), Pep039 A e B (correspondendo respectivamente as sequências TCPAGQKICFKKWKKG e PKPKKDETIQCCTKNN), Pep0100 (PDDFTCVKKWEGGRRV), PepPLA<sub>2</sub> A e B (NLINFQRMICQCTTTRSAW e NCDRTAALCFGRAPYNKNN). Para a síntese solúvel, as cisteínas das sequências foram substituídas por serinas (com o objetivo de evitar a formação de pontes-dissulfeto). A serina, assim como a cisteína, é também um aminoácido polar, não carregado, com alta solubilidade em água devido a seu grupo hidroxila (Nelson & Cox, 2002), o que é um fator importante para a síntese de peptídeos solúveis. Para que seja possível a quantificação dos peptídeos por absorvância, é necessária a detecção na faixa de 280 nm, o que é possível na presença de fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, histidina, tirosina e triptofano. Às sequências que não possuíam aminoácidos aromáticos para possibilitar essa detecção, um triptofano no C-term do peptídeo foi adicionado. Após a síntese, os peptídeos

foram liofilizados e ressuspensos em água. A 280 nm, em pH neutro, o triptofano possui uma absorvidade molar significativamente grande ( Zaia *et al*, 1998).

Uma vez atestada a pureza e qualidade dos peptídeos solúveis, coelhos foram utilizados para imunização visando a produção de anticorpos anti-peptídeo. Os peptídeos foram emulsificados em adjuvante completo de Freund, um dos mais utilizados em pesquisa. Para primeira dose, utilizou-se adjuvante completo, que contém bactérias mortas de *Mycobacterium tuberculosis*, e nas cinco doses posteriores, adjuvante incompleto (sem bactérias). A utilização do adjuvante baseou-se na intenção da liberação contínua de antígenos para o estímulo da resposta imune, como descrito pelo fabricante.

Ao analisar a reatividade por ELISA do soro dos animais após a sexta dose do primeiro ciclo, notou-se um alto reconhecimento dos venenos de *Micrurus* pelo soro dos coelhos imunizados com veneno de *M. frontalis* e peptídeos sintéticos de *M. corallinus*. É importante ressaltar que o antiveneno elapídico produzido no Brasil contém um concentrado de imunoglobulinas específicas obtidas do plasma de equinos imunizados com uma mistura de venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*. (Silva Júnior & Bucarechi, 2009), o que justifica a escolha da forma de imunização dos animais deste grupo.

Após a última dose do primeiro ciclo, os animais imunizados com peptídeo sintético não demonstraram um título satisfatório nos testes de ELISA. A estratégia de imunização continuou em um segundo ciclo de imunizações, onde aos animais de ambos os grupos foram imunizados com peptídeos sintéticos. No novo ciclo, utilizaram-se os antígenos emulsificados em adjuvante de Montanide, um adjuvante da categoria óleo em água ou água em óleo. A emulsão forma um depósito no sítio de injeção, permitindo a lenta liberação dos antígenos e a estimulação da produção de anticorpos. Além disso, este adjuvante é considerado menos tóxico, menos viscoso, mais estável e de mais fácil administração do que o clássico Freund (Petrovsky; Aguilar, 2004).

Após o segundo ciclo, a reatividade dos anticorpos dos coelhos frente aos antígenos de *Micrurus* mostrou-se elevada. O soro e IgGs dos coelhos de ambos os grupos foi capaz de reconhecer por ELISA os venenos de *M. frontalis*, *M. corallinus* e *M. lemniscatus*. Sabe-se que, assim como o veneno de *M. frontalis*, *M. lemniscatus* possui neurotoxinas de ação pós sináptica e também neurotoxinas de ação pré sináptica com atividade fosfolipásica (Silva Júnior & Bucarechi, 2009; Tanaka *et al.*, 2010) o que pode explicar a reatividade cruzada encontrada nos testes de ELISA. Esse aumento de resposta pode ter ocorrido devido ao intervalo entre os ciclos, visto que a re-exposição a um antígeno aumenta a habilidade de

resposta, ou devido à utilização de outro adjuvante. Já foi demonstrado que a emulsão água-em-óleo do adjuvante de montanide tende a gerar uma produção rápida de anticorpos, muitas vezes podendo ser utilizada até uma menor concentração de antígenos o que ainda gera uma resposta satisfatória (Corradin; Giudice, 2005).

Analisou-se também o reconhecimento dos peptídeos pelo soro dos coelhos imunizados com o pool de peptídeos correspondentes as neurotoxinas de *M. corallinus*. Após a conjugação dos peptídeos com glutaraldeído, notou-se que o soro dos animais foi capaz de reconhecer com títulos elevados a maioria dos peptídeos tanto após o primeiro ciclo, quanto após o segundo ciclo de imunizações. A resposta dos coelhos foi variada, mas de maneira geral notou-se um aumento da resposta após o segundo ciclo de imunizações. Os peptídeos Pep039a e PepPLA<sub>2</sub>b mostraram títulos baixos mesmo após o segundo ciclo. Porém, os Pep039b e PepPLA<sub>2</sub>a mostraram ser bons candidatos antigênicos de acordo com o título observado, estando portanto presentes anticorpos contra todas as toxinas estudadas. Nota-se então que a maior parte dos peptídeos demonstrou ser efetivamente imunogênica visto os títulos satisfatórios obtidos nos testes de ELISA.

O ensaio de Western Blot utilizando o veneno de *M. frontalis* foi útil para avaliar a detecção das bandas pelo soro produzido pelos coelhos. O soro comercial antielapídico produzido pela FUNED e soro de coelho anti-*M. corallinus* foram utilizados como um controle positivo, assim como o soro pré-imune de coelho foi utilizado como controle negativo. O soro dos animais demonstrou reconhecer proteínas de diferentes massas moleculares, principalmente as de baixo peso molecular. As massas de 6 a 8 kDa correspondem as 3FTX e as de 12 a 14 as PLA<sub>2</sub> (Ciscotto *et al.*, 2011). Os soros dos animais que foram imunizados com peptídeos sintéticos mostrou ser capaz de reconhecer majoritariamente proteínas de baixo peso molecular, o que sugere um maior reconhecimento de neurotoxinas, principalmente do tipo pós-sinápticas.

A capacidade do soro dos coelhos de neutralizar a atividade letal do veneno (um parâmetro para avaliação da neurotoxicidade dos venenos de *Micrurus* segundo Tanaka e colaboradores -2010) foi testada. O pool dos soros dos coelhos imunizados com peptídeos sintéticos foi capaz de neutralizar 50% a atividade letal de *M. corallinus* e de *M. frontalis* em camundongos. Apesar da transcriptômica do veneno de *M. corallinus* ter demonstrado que sua composição é em maior parte de 3FTX e PLA<sub>2</sub>, que representam 85% dos transcritos, os venenos são misturas biológicas complexas, e o veneno desta serpente apresenta uma diversidade de toxinas, como metaloproteases, lectinas do tipo C, serino proteases, dentre

outras (Leão; Ho; Junqueira-de-Azevedo, 2009), o que pode explicar a incapacidade do soro de neutralizar totalmente a atividade letal do veneno. O soro de animais imunizados com veneno de *M.frontalis* e com os peptídeos sintéticos de *M.corallinus* foi capaz de neutralizar 100% da atividade letal do veneno de *M.corallinus* e 50% da atividade letal do veneno de *M.frontalis*. O veneno bruto de *M.frontalis* para imunização dos animais poderia ser aplicado em um maior número de doses, possivelmente no segundo ciclo de imunizações, para que a capacidade do soro produzido pelos animais de neutralizar o veneno bruto seja potenciada. Novos testes de neutralização também podem ser realizados com uma maior quantidade de soro inoculada por animal, para avaliar de maneira dose- dependente a ação destes soros de reconhecer e neutralizar os antígenos de *M.frontalis*.

Os venenos de *Micrurus* possuem variáveis níveis de fosfolipases, sendo elas mais presentes nos venenos de *M.frontalis* (Tanaka *et al.*, 2010), o que foi notado durante a determinação da dose hemolítica mínima, onde uma menor concentração de veneno de *M.frontalis* foi capaz de causar atividade hemolítica em comparação do veneno de *M.corallinus*. Essa capacidade das imunoglobulinas anti peptídeos de neutralizar também a atividade de do veneno de *M.frontalis* pode ser explicada pela alta similaridade que as sequências de fosfolipases possuem, bem como significativa similaridade tridimensional. (Doley *et al.* 2010) Um trabalho anterior de Tanaka e colaboradores (2010) utilizando outro método de determinação e neutralização da atividade fosfolipásica, demonstrou que o soro comercial distribuído pelo Instituto Butantan (produzido pela hiperimunização de cavalos com 50% de veneno de *M.corallinus* e 50% de veneno de *M.frontalis*), é capaz de neutralizar 100 da atividade fosfolipásica do veneno de *M.corallinus*, mas não é capaz de neutralizar totalmente a atividade fosfolipásica do veneno de *M.frontalis*. O desenvolvimento de um esquema de imunização baseado na utilização de veneno bruto e peptídeos sintéticos pode se tornar uma estratégia eficaz na neutralização de atividades enzimáticas do veneno.

O presente trabalho conseguiu atingir os objetivos propostos e pode ser base para estudos futuros que possam contribuir para a produção de soro antielapídico. Apesar da pouca frequência de ocorrência de acidentes com serpentes do gênero *Micrurus*, os venenos de corais são altamente tóxicos, as reações sistêmicas são caracterizadas pela ação neurotóxica pré e pós-sináptica do veneno, e devem ser combatidas para evitar um agravamento do caso (Silva Júnior & Bucarechi, 2009; Tanaka *et al.*, 2010). O tratamento específico é a administração de soro antielapídico, que como já foi ressaltado, é considerado um soro de difícil fabricação devido a escassez de veneno das serpentes do gênero *Micrurus*, devido a

dificuldade de manutenção das espécies em cativeiro e à presença de glândulas de veneno reduzidas.

A hiperimunização de cavalos com toxinas para a produção de soro 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 antielapídicos, 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.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir para a evolução do desenvolvimento de soros antiveneno brasileiros. Buscou-se uma nova estratégia de imunização para a produção de soros antielapídicos, visando à busca de novas soluções para as demandas encontradas pelos centros de produção.

A estratégia de imunização de animais com veneno bruto e peptídeos sintéticos mostrou ser uma escolha interessante na produção de soros. Concluiu-se que animais imunizados com uma combinação de veneno bruto e peptídeos sintéticos, produzem um soro capaz de reconhecer o veneno de *Micrurus sp.*, de inibir a atividade fosfolipásica de *M.frontalis* e *M.corallinus* e de neutralizar a ação letal do veneno de *M.corallinus*. Além disso, o soro de animais imunizados somente com peptídeos sintéticos também é capaz de reconhecer o veneno de serpentes do gênero *Micrurus*, de inibir a atividade fosfolipásica das espécies *M.frontalis* e *M.corallinus* e de neutralizar parcialmente a atividade letal do veneno.

Concluiu-se que os resultados obtidos neste trabalho demonstram uma base para a identificação de epitopos neutralizantes em toxinas de cobras corais e mostram que seus peptídeos sintéticos correspondentes podem contribuir para a geração de inovações na imunoterapêutica contra o veneno de corais.

Baseando-se nos estudos já desenvolvidos do sequenciamento de toxinas do veneno de *M.frontalis* (Moreira *et al.*, 2010) a localização, caracterização e síntese de epitopos das toxinas de *M. frontalis* poderá também ser utilizada como estratégia na produção de soro antielapídico. Os testes de imunização também poderão ser realizados em animais de grande porte.

Novos testes devem ser conduzidos a fim de descobrir a melhor estratégia de imunização e de testar a capacidade do soro de neutralizar outras atividades do veneno bem como sua ação frente a ação neurotóxica do mesmo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S. D.; DA SILVA, N. J. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, v. 99, n. 2, p. 287–94, jan. 1991.

ALIROL, E. et al. Snake bite in South Asia: a review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e603, jan. 2010.

ARTIMO, P. et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Web Server issue, p. W597–603, jul. 2012.

BÉNARD-VALLE, M. et al. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. **Toxicon** : official journal of the International Society on Toxinology, v. 77, n. October, p. 6–15, jan. 2014.

BOCHNER, Rosany; STRUCHINER, Cláudio. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.3, p.735-746, mai.-jun.2002.

BORDOLI, L. et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, jan. 2009.

BRADFORD, Marion M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, United States of America, n. 72, p. 248-253, 1976.

CARDOSO, João Luiz Costa; WEN, Fan Hui. Introdução ao Ofidismo. Em: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 1, p.3-21.

CECCHINI, A. L. et al. Biological and enzymatic activities of *Micrurus sp.* (Coral) snake venoms. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, v. 140, n. 1, p. 125–34, jan. 2005.

CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS DE SANTA CATARINA (CIT). Animais: serpentes, o que são. Santa Catarina, 2013. Disponível em <<http://www.cit.sc.gov.br/index.php?p=cit>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

CHANDRUDU, S.; SIMERSKA, P.; TOTH, I. Chemical methods for peptide and protein production. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 18, n. 4, p. 4373–88, jan. 2013.

CISCOTTO, P. H. C. et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1810–25, 24 ago. 2011.

COMITE DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA). Princípios éticos para o uso de animais de experimentação. Universidade Federal de Minas Gerais, 2014. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/>>. Acesso em 2 abr. 2014.

CORRADIN, G.; GIUDICE, G. Novel Adjuvants for Vaccines. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents**, v. 4, n. 2, p. 185–191, 1 abr. 2005.

DANGI, K. S.; MISHRA, S. N. COBALT : Multiple Protein Sequences Alignment Tool In Analysis of Cytochrome b Based Protein Diversity of osteichthyes . **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 201–206, 2011.

DE CARVALHO, N. D. et al. Neurotoxicity of coral snake phospholipases A<sub>2</sub> in cultured rat hippocampal neurons. **Brain research**, v. 1552, p. 1–16, 27 jan. 2014.

DE OLIVEIRA JUNIOR, N. G.; E SILVA CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 70, n. 24, p. 4645–58, dez. 2013.

DE OLIVEIRA, U. C. et al. Cloning and characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 249–255, set. 2003.

DEL BRUTTO, O. H.; DEL BRUTTO, V. J. Neurological complications of venomous snake bites: a review. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 125, n. 6, p. 363–72, jun. 2012.

DOLEY, Robin; ZHOU, Xingding; KINI, Manjunatha. Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes. Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes. . In: **Handbook of Venoms and Toxins**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2010. Chap 8, p. 174-195.

DUARTE, C. G. et al. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1168–76, 3 fev. 2010.

FELICORI, L. et al. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4201–8, 24 jun. 2009.

FRANCO, Francisco Luís. Origem e Diversidade das Serpentes. Em: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 3, p. 22-41.

FRANK, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. **Journal of immunological methods**, v. 267, n. 1, p. 13–26, 1 set. 2002.

FRY, B. G. et al. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Toxicon** : official journal of the International Society on Toxinology, v. 60, n. 4, p. 434–48, 15 set. 2012.

GOLAN, et al. **Princípios de farmacologia**: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2.ed. Brasil: Guanabara Kogan, 2009.914 p.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714–23, dez. 1997.



GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, jun. 2006.

HANCOCK, D.; O' REILLY, N. Synthetic Peptides as Antigens for Antibody Production. In: **Methods in Molecular Biology**, 3 ed. New Jersey: Immunochemical Protocols, 2005. 317 p.

HO, P. L. et al. Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 250, n. 1, p. 144–9, 15 nov. 1997.

INNOVAGEN AB. **Peptide property calculator**. United Kingdom, 2014. Disponível em < <http://www.innovagen.se/> >. Acesso em 2 mai. 2014.

JIANG, Y. et al. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, jan. 2011.

JORGE DA SILVA, N.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p. 425–456, may. 2006.

KENNETH, M.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de janeway**. 7ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 908 p.

KEOGH, J. S. Molecular phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, p. 177–203, 2006.

KIMMERLIN, T.; SEEBACH, D. “100 Years of Peptide Synthesis”: Ligation Methods for Peptide and Protein Synthesis With Applications To Beta-Peptide Assemblies. **The journal of peptide research** : official journal of the American Peptide Society, v. 65, n. 2, p. 229–60, fev. 2005.

KINI, R. M. Invited Paper : Animal Toxins of Asia and Australia . Molecular Moulds with Multiple Missions: Functional Sites in Three-Finger Toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, n. 29, p. 815–822, apr. 2002.

KOPPER, R. A et al. Comparison of total protein and phospholipase A<sub>2</sub> levels in individual coralsnake venoms. **Toxicon** : official journal of the International Society on Toxinology, v. 76, p. 59–62, 15 dez. 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, n. 227, p. 680-685. 1970.

LARIN, Oleg. **Peptide Guide**. Mendeleev Russian University of Chemistry and Technology, Russia, 2011. Disponível em < <http://www.peptideguide.com/> >. Acesso em 2 mai. 2014.

LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. D. L. M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. **BMC genomics**, v. 10, p. 112, jan. 2009.

MACHADO, A. et al. Sínteses Química e Enzimática de Peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, jun. 2004.

MACHADO DE AVILA, R. A et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*: official journal of the International Society on Toxinology, v. 44, n. 3, p. 233-41, 1 set. 2004.

MACHADO DE AVILA, R. A et al. Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640-6, ago. 2011.

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

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. Em: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 4, p.42-70.

MERRIFIELD R.B; WANG, Su-Sun. Preparation of some new biphenylsopropylcarbonyl amino acids and their application to the solid phase synthesis of a tryptophan-containing heptapeptide of bovine parathyroid hormone. **Chemical Biology & Drug Design**, United States of America, v.1, n. 4, p. 235-244, Dec 1969.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília, Brasil, 2001. 120 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da saúde alerta para acidentes com animais peçonhentos. Brasil, 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/6959->>. Acesso em 22 abr. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos: Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - **Sinan Net. Brasil**, 2014. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>>. Acesso em 22 abr. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por Animais Peçonhentos – Utilização Racional de Antivenenos**. Brasil, 2014. Disponível em < <http://portalsaude.saude.gov.br/> >. Acesso em 22 abr. 2014.

MOREIRA, K. G. et al. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. **Toxicon**: official journal of the International Society on Toxinology, v. 56, n. 1, p. 55-63, 1 ago. 2010.

MUSEU INSTITUTO BUTANTAN. **Serpentes peçonhentas**. São Paulo: 2008. Disponível em: < <http://pt.scribd.com/doc/1034585/serpentes-brasileiras-peconhentas-butantan>>. Acesso em 4 abr. 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. L. **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NIRTHANAN, S.; GWEE, M. C. E. Critical Review Three-Finger -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor , Forty Years On. **Journal of Pharmacological Sciences** ,v. 17, p. 1–17, 2004.

OLORTEGUI, C. C.; AMARA, D.A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. **Vaccine**, n9, v.12, p. 907-910, 1991.

PERUMAL SAMY, R. et al. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). **Biochimie**, v. 90, n. 9, p. 1372–88, set. 2008.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology** , v. 82, p. 488–496, 2004.

PINHO, F.M.O; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Brasil, v.47, n.1, mar. 2001.

POUGH, F. Harvey; HEISER, John B.; JANIS, CRISTINE, M. **A vida dos vertebrados**. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 718 p.

QUAN, D. North American poisonous bites and stings. **Critical care clinics**, v. 28, n. 4, p. 633–59, out. 2012.

RUBINSTEIN, N. D. et al. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. **BMC bioinformatics**, v. 10, p. 287, jan. 2009.

SCHNEIDER, F. S. et al. Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity-Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from *Bothrops atrox* Snake Venom. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2826, 24 abr. 2014.

SERAPICOS, Eliana de Oliveira.; MERUSSE, José Luiz Bernardino. Análise comparativa entre tipos de alimentação de *Micrurus corallinus* (Serpente, Elapidae) em cativeiro. **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 92, n. 4, p. 99-103, dez. 2002.

SILVA, Alex Sandra Tributino da. **Soros e Vacinas**. São Paulo: Instituto Butantan, 2013. 59 p.

SILVA JÚNIOR, Nelson Jorge da; BUCARETCHI, Fábio. Mecanismos de Ação do Veneno Elapídico e Aspectos Clínicos dos Acidentes. Em: **Animais Peçonhentos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 9, p. 116-124.

SMIALOWSKI, P. et al. Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 23, n. 19, p. 2536–42, 1 out. 2007.

SOUSA, B. M. DE et al. Répteis em fragmentos de Cerrado e Mata Atlântica no Campo das Vertentes , Estado de Minas Gerais , Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, 2006.

STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil : uma revisão Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil : a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7–16, jan-fev. 2003.

STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação Recording of venomous bites and stings by National Information Systems in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. d, n. 3, p. 735–746, mai-jun. 2002.

SUNAGAR, K. et al. Three-fingered RAVERS: Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues of snake venom toxins. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2172–208, nov. 2013.

TAMIYA, T.; FUJIMI, T. J. Molecular evolution of toxin genes in Elapidae snakes. **Molecular diversity**, v. 10, n. 4, p. 529–43, nov. 2006.

TANAKA, G. D. et al. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e622, jan. 2010.

THE UniProt CONSORTIUM. Activities at the Universal Protein Resource (**UniProt**). Nucleic Acids. Nucleic Acids Research, 2014. Disponível em < <http://www.uniprot.org/> >. Acesso em 2 mai. 2014.

The PyMOL Molecular Graphics System. **PyMOL**, Version 1.3 Schrödinger, LLC. Disponível em < <http://www.pymol.org/>>. Acesso em 28 abr. 2014.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, 11 nov. 1994.

URDANETA, A. H.; BOLAÑOS, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 138, n. 4, p. 485–92, ago. 2004.

UTKIN, Y. N. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. **Toxicon** : official journal of the International Society on Toxinology, v. 62, p. 50–5, fev. 2013.

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

VONK, F. J. et al. 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, abr. 2011.

WEINSTEIN, Scott A.; SMITH, Tamara L.; KARDONG, Kenneth V. Reptile Venom Glands: Form, Functions and Future. In: **Handbook of Venoms and Toxins**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2010. Chap. 3, p.65-94.

WHITE, Julian. Envenomation: Prevention and Treatment in Australia. In: **Handbook of Venoms and Toxins**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2010. Chap. 21, p. 423-452.

ZAIA, D.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. **Química Nova**, n. 21, v.6, p. 787- 793, jun.1998.

ZAQUEO, K. D. et al. Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom. **BioMed research international**, v. 2014, p. 595186, jan. 2014.

ZHANG, H.-L. et al. Structure of a cardiotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Ophiophagus hannah* with the “pancreatic loop”. **Journal of structural biology**, v. 138, n. 3, p. 207–15, jun. 2002.