

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E IMUNOGÊNICA DE UMA
PROTEÍNA DERMONECRÓTICA RECOMBINANTE (RLID1) DO VENENO DA
ARANHA *LOXOSCELES INTERMEDIA*.**

**PERSPECTIVAS NA GERAÇÃO DE ANTIVENENOS UTILIZANDO EPITOPOS
SINTÉTICOS**

LIZA FIGUEIREDO FELICORI VILELA

BELO HORIZONTE

AGOSTO - 2008

LIZA FIGUEIREDO FELICORI VILELA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E IMUNOGÊNICA DE UMA
PROTEÍNA DERMONECROTICA RECOMBINANTE (RLID1) DO VENENO DA
ARANHA *LOXOSCELES INTERMEDIA*. PERSPECTIVAS NA GERAÇÃO DE
ANTIVENENOS UTILIZANDO EPITOPOS SINTÉTICOS.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pos-
graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

ORIENTADOR: DR. CARLOS CHAVEZ OLÓRTEGUI

CO- ORIENTADOR: DR. EVANGUEDES KALAPOTHAKIS

BELO HORIZONTE

AGOSTO - 2008

Este trabalho foi realizado:

no Laboratório de Imuniquímica de Proteínas, ICB, UFMG;

no Laboratório de Toxicologia, da Escola de Veterinária, da UFMG;

no Laboratório de Bioquímica de proteínas, da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte –MG;

no Centro de Farmacologia e Biotecnologia da Saúde (CPBS), Montpellier, França.

E, contou com o apoio financeiro do:

Departamento de Bioquímica e Imunologia- ICB- UFMG;

CNPq;

Programa CAPES-COFECUB;

FAPEMIG.

Dedicatória

Dedico esta tese à toda minha família, em especial à minha Tia Marion, que me acolheu em sua casa e seu coração como filha. Muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração e apoio de muitas pessoas, dentre elas, gostaria de agradecer especialmente:

Ao Doutor, Professor, Pai, Amigo e Mestre Carlos Chavez por todas as oportunidades, pela convivência diária agradável, pela confiança e pelo aprendizado constante. Minha eterna gratidão!!!

Ao Dr. Eladio Flores Sanchez, com quem comecei minha vida científica. Obrigada pelo incentivo e confiança.

Ao Dr. Evanguedes Kalapothakis pelos ensinamentos teóricos e práticos, pelos conselhos, pela grande contribuição na formação acadêmica e pelos momentos divertidos (Allez, Allez!).

Ao caríssimo Professor Tomaz, pelas conversas agradáveis e inesquecíveis, pela serenidade e pela sabedoria transmitidas. Agradeço a oportunidade de termos trabalhado juntos.

À professora Marília e aos membros de sua equipe, em especial à Marica, Durval, Paulo, Elaine, Eduardo, Mariana e Guilherme pela ajuda na experimentação animal. Obrigada pela atenção e gentileza.

À Dra. Raquel Gouvêa pelos experimentos com técnico e ao Dr. Adriano Pimenta com todo o auxílio nos experimentos de espectrometria de massas.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório: Chris Cartelle, Michelle Barbi, Paula Henriques e Paula Castanheira, Alessandra, Dulcilene, e o Pai (hehe), Marianas, Danielle, Eduardo, Thiago vet, Vinício, Lourena, Melina, Balu e Vanessa, pelas discussões proveitosas, pelo companheirismo e amizade. Em especial, agradeço:

Ao Diogo, pela amizade, companheirismo, discussões e ajuda experimental; Ao Ricardo, pela ajuda nos experimentos de cromatografia; Ao Eric Bawer... um companheiro recente que muito contribuiu para a finalização deste trabalho, graças aos métodos Bawer...

À Paulex... pelos meses de experimentos com os coelhos, pela ótima convivência, pela ajuda com os problemas de laboratório. Sem você não teria sido possível a realização de grande parte deste trabalho... Ao Miguelito e à Clara pelas discussões saudáveis e proveitosas. À Christina, uma amiga para a vida toda. À Camila Lopes, pela alegria e disposição constantes em prol do laboratório e pelos trabalhos juntos, pelas correções. Pena que o tempo foi pouco para trabalharmos juntas!! Ao Léo, que muito contribuiu nos experimentos de spot; Às Gabrielas pelos auxílios experimentais; Ao Thiago Guzella pela boa vontade, pela ajuda com a análise de estabilidade da proteína e pela convivência enriquecedora.

À Simone Araujo, que realizou a clonagem de rLiD1 e quem iniciou o trabalho;

À Juju e ao Mario que me deixaram o 'legado' de *Loxosceles* no laboratório e portaram as idéias iniciais deste trabalho;

À Dona Carminha que permitiu que trabalhasse em um ambiente com 'cheirinho';

A todos os amigos e colegas do CPBS e SysDiag que foram muito importantes na minha formação. Ao querido 'Manou', Stephanie, Veronique, Catherine, Leticia, Emilie, Maxime, Philippe, Sylvie Villard, Miriam, Sandra, Gaspar, karrima e Gregor. Em especial, agradeço:

Ao Dr. Claude Granier que me recebeu muito bem em seu laboratório, que foi meu 'pé no chão', um grande critico, com quem muito aprendi;

Ao Dr. Franck Molina, que me ensinou a ter idéias diferentes e 'mirabolantes' e que me fez enxergar a ciência de uma forma diferente;

À minha grande amiga e irmã Violaine Moreau, com quem dividi o 'bureau' um ano e que se tornou uma pessoa muito importante em minha vida tanto profissionalmente quanto pessoalmente; Muito obrigada por todas as sugestões!!!

Às queridas Cécile e Larissa que tornaram minha estadia na França muito agradável e que sempre me ajudaram nos momentos que mais precisei. Serei eternamente grata.

Ao Christophe Nguyen pela síntese das membranas de SPOT e auxílio na síntese peptídica;

À Catherine Poullet, pela eficiência e pela assistência técnica;

Ao Jean-Paul, Thierry e Leonel por toda a discussão e pelos ensinamentos;

À Professora Santuza e aos amigos de seu laboratório: Pri.... amiga, orientadora e um grande exemplo de perseverança e determinação; Fabiano, por todas as discussões e pela força e apoio em projetos diversos; ao Ramon, Joãozinho, Thiago, pela prestreza e pelos momentos de descontração; e à Paty, pelas discussões, ajudas experimentais, correções da tese e pela convivência sempre agradável;

Aos colegas de bases e do departamento;

Ao Professor Marcelo Santoro, pelas discussões proveitosas e ao amigo Jamil, pela convivência agradável, pelo bom humor e principalmente a grande ajuda na realização deste trabalho. À Celise, Grazielle, Pollyana e Bruno por todo o auxílio administrativo;

Aos grandes amigos: Heveline, Susca, Aline, Ju, Muchacha, Sandrinha, Zifia, Luana, Lerê, Ana P., Lalazinha por entenderem minha ausência e por fazerem minha vida mais feliz;

À toda minha família, especialmente minha mãe, vó, vô, tio, Elisângela, Juju e Aninha, meus pilares, o que há de mais importante na minha vida!!! Obrigada por me apoiarem em todas as minhas decisões....

ÍNDICE

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	I
Quadro de Aminoácidos	III
Lista de Figuras.....	IV
Lista de Tabelas.....	VII
Abstract.....	VIII
Resumo	IX
1 Introdução.....	1
1.1 Das Aranhas.....	3
1.2 Aranhas Do Gênero <i>Loxosceles</i>	4
1.3 Epidemiologia.....	6
1.4 Das Glândulas Veneníferas	8
1.5 Manifestações Clínicas Do Loxoscelismo	9
1.6 Toxinas	11
1.7 Mecanismo de Ação Do veneno Loxoscélico	11
1.7.1 Ativação do sistema do complemento	13
1.7.2 Ativação de Metaloproteases.....	13
1.7.3 Bioquímica De Ação	14
1.7.4 Outros fatores envolvidos no desenvolvimento da lesão	15
1.8 Patologia Relacionada ao Loxoscelismo.....	15
1.9 Diagnóstico e Tratamento.....	16
1.10 Antivenenos e Anticorpos	18
1.11 Peptídeos e Epítopos.....	19
1.12 Proteômica	23
2 Objetivos	28
2.1 Objetivos Gerais	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 Material e Métodos	29
3.1 Animais e venenos	29
3.2 Antivenenos	29
3.3 Enzimas e reagentes.....	30
3.4 Clonagem da proteína recombinante rLiD1.....	30
3.5 Expressão e Purificação De rLiD1	30
3.6 Ensaios de mutagenese sítio dirigida	31
3.7 Amplificação dos fragmentos mutados	35
3.8 Dot Blot	35
3.9 Espectrometria de massa.....	35
3.10 Dosagem de proteína	36

3.11	Eletroforese e Western Blot.....	36
3.11.1	Gel SDS-PAGE.....	36
3.11.2	Método de coloração pela Prata	37
3.11.3	Eletrotransferência	37
3.11.4	<i>Western blot</i>	37
3.12	Redução e Alquilação	38
3.13	Atividade Dermonecrótica	39
3.14	Ensaio hemolítico	40
3.15	Atividade Esfingomielinásica.....	40
3.16	Atividade de agregação plaquetária	41
3.17	Protocolos de Imunização	41
3.18	Purificação de imunoglobulinas	42
3.19	ELISA.....	43
3.19.1	ELISA indireta	43
3.19.2	ELISA de competição.....	43
3.20	Síntese de peptídeos em membrana de celulose.....	44
3.21	Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana	47
3.22	Ciclização De Peptídeos na Membrana de Spot	47
3.23	Análise da reatividade dos spots.....	47
3.24	Regeneração da membrana	47
3.25	Síntese solúvel de peptídeos.....	48
3.26	Purificação dos peptídeos sintéticos.....	49
3.27	Ensaio de toxicidade	50
3.27.1	Atividade dermonecrótica	50
3.27.2	Medida de edema e da área hemorrágica.....	50
3.28	Bioinformática.....	51
3.28.1	Modelagem Molecular.....	51
3.28.2	Alinhamento estrutural	51
3.28.3	PEPOP.....	51
3.28.4	MIMOP.....	52
3.28.5	Análise de resíduos estabilizadores.....	52
4	Resultados.....	54
4.1	Expressão e Purificação de rLiD1	54
4.2	Caracterização funcional de rLiD1	58
4.3	Modelo Tridimensional de rLiD1.....	62
4.4	Estudos Imunológicos	63
4.5	Peptídeos lineares de rLiD1 e Imunoensaio.....	65
4.6	Síntese do peptídeo e Imunização	68
4.7	Ensaio de neutralização in vivo	68

4.8	Imunoensaios	71
4.9	Síntese Dos Epitopos	71
4.10	Imunização com rLiD1 e Seus Epitopos.....	75
4.11	Ensaio de neutralização “in vitro”	82
4.12	Ensaio de neutralização “in vivo”	84
4.13	Localização dos epitopos anti-rLiD1 e anti-peptídeos	86
4.14	Reatividade do soro anti- rLiD1 frente a outras proteínas do veneno de L. intermedia.....	89
4.15	Imunoreatividade de Smase I.....	102
4.16	Estudo De Epitopos Descontínuos	107
4.17	Análise de resíduos estabilizadores do TIM barril	118
5	Discussão.....	120
6	Conclusão.....	130
7	Perspectivas	132
8	Referências Bibliográficas	134
9	Anexos.....	152

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
ADP	Adenosina difosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol
CBS	Tampão Acido Citrico, NaCl, KCl
cDNA	Acido Desoxirribonucléico complementar
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DIPC	diisopropilcarbodiimida
DMF	dimetilformamida
DMN	Dose minina necrosante
DMSO	dimetilsulfoxide
DO	Densidade optica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fmoc	fluorenil metil oxicarbonila
H ₂ O ₂	Água oxigenada
HOBT	hidroxibenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
i.d.	Intra-dérmica
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosidio
KDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LiD1	<i>Loxosceles intermedia</i> dermonecrotic protein 1
Limab7	<i>Loxosceles intermedia</i> monoclonal antibody 7
LiRecDT	<i>Loxosceles intermedia</i> Recombinante Dermonecrotic Toxin
LPA	Ácido lisofosfatidico
LPC	1-o-hexadecilglicero- 3-fosfocolina
MIMOP	Mimotope prediction
MTT	Tiazolyl Blue
Nm	nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamino
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Polimerase Chain Reaction
PEG	polietilenoglicol
PEPOP	Peptide prediction
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMC	Células polimorfonucleares
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSA	Persulfato de Amônio
rLiD1	Recombinant <i>Loxosceles intermedia</i> dermonecrotic protein 1
RPM	Rotações por minuto
s.c.	subcutânea

SDS	Didecil Sulfato de Sodio
Smase	Esfingomielinase
SPPS	Síntese de peptídeo em fase solida
TBE	Tampão Tris- Borato-EDTA
TBS	Tampão Tris, KCl, NaCl
TEMED	Tetrametiletenodiamino
TFA	Acido Trifluoroacetico
U.V.	Ultra Violeta
xg	gravidade

QUADRO DE AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação
Glicina	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	T
Cisteína	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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	5
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> DE IMPORTÂNCIA MÉDICA.....	6
FIGURA 3 - NÚMERO DE ACIDENTES POR ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> EM CURITIBA.....	7
FIGURA 4- QUADRO DE LOXOSCELISMO.....	10
FIGURA 5- PROPOSTO MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES</i> E OPÇÕES DE TRATAMENTO.....	12
FIGURA 6- PERFIL PROTÉICO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	24
FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DE RLID1.....	32
FIGURA 8 - MAPA CIRCULAR E SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO PET11A	34
FIGURA 9- PADRÃO PARA MEDIDAS DE ÁREAS.....	39
FIGURA 10 - MULTYPEP	46
FIGURA 11- EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE RLID1.....	55
FIGURA 12- ANÁLISE DE RLID1 EM GEL DE POLIACRILAMIDA E <i>WESTERN-BLOT</i>	56
FIGURA 13 - ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RLID1.....	57
FIGURA 14 - ATIVIDADE DERMONECRÓTICA DE RLID1.....	58
FIGURA 15 - CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE RLID1.....	61
FIGURA 16- MODELO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LID1.....	62
FIGURA 17- ELISA.....	64
FIGURA 18- REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE LID1 COM O SORO DE CAMUNDONGOS ANTI-RLID1..	67
FIGURA 19- TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEO POR ELISA.....	69
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ÁREA DERMONECRÓTICA.....	70
FIGURA 21 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS COM O SORO DE CAVALO ANTI-VENENO DE <i>L.INTERMEDIA</i>	73

FIGURA 22- TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS E ANTI-RLID1 FRENTE À RLID1 POR ELISA.	76
FIGURA 23- TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS E ANTI-LID1 FRENTE AOS PEPTÍDEOS.....	77
FIGURA 24 – ELISA PARA VERIFICAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS.....	79
FIGURA 25 - LOCALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO 3 (SKKYENFNDFLKGLR) NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE RLID1.....	80
FIGURA 26 - REATIVIDADE DE DIFERENTES VENENOS FRENTE AO SORO DOS DIFERENTES GRUPOS DE COELHOS IMUNIZADOS.....	81
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES NECRÓTICAS, HEMORRÁGICAS E EDEMATOGÊNICAS MEDIANTE INCUBAÇÃO DE RLID1 COM ANTICORPOS DOS DIFERENTES GRUPOS.....	83
FIGURA 28 – AVALIAÇÃO IN VIVO DA INIBIÇÃO DA ÁREA DERMONECROTICA, ALO HEMORRÁGICO E EDEMA DOS GRUPOS IMUNIZADOS FRENTE AO DESAFIO COM RLID.	85
FIGURA 29 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOACIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE LID1.....	88
FIGURA 30 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE LIRECDT2	91
FIGURA 31 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE LOXTOX I5.....	93
FIGURA 32 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE LOXOTOX I7	95
FIGURA 33 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOACIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE LIRECDT5.....	97
FIGURA 34 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 15 AMINOACIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE LIRECDT4.....	99
FIGURA 35 - ALINHAMENTO DAS 6 PROTEINAS DE <i>L. INTERMEDIA</i> ESTUDADAS.....	101
FIGURA 36 - REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DE 25 AMINOACIDOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMARIA DE SMASE 1 COM O SORO DE COELHO ANTI-RLID 1.....	105
FIGURA 37 - ALINHAMENTO ESTRUTURAL DE LID1 E SMASE1 DE <i>L. LAETA</i>	106
FIGURA 38 - REATIVIDADE DA SEQÜÊNCIA LINEAR DA LID1 FRENTE AO ANTICORPO MONOCLONAL 7 ANTI <i>L. INTERMEDIA</i> (LIMAB7).....	107

FIGURA 39 - PEPTÍDEOS PREDITOS POR PEPOP E SUA REATIVIDADE FRENTE AO ANTI-RLID1.....	111
FIGURA 40 – MIMOTOPOS DE RLID1 IDENTIFICADOS POR MIMOP	113
FIGURA 41 – GEL DE AGAROSE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR.....	117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROTEÍNAS DE 30 A 35 KA DO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i>	25
TABELA 2 – INICIADORES DESENHADOS PARA O ESTUDO DE MUTAGÊNESE SITIO DIRIGIDA	33
TABELA 3 – ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO DE COELHOS.....	42
TABELA 4 - EXPERIMENTO DE PROTEÇÃO <i>IN VIVO</i>	65
TABELA 5 - PEPTÍDEOS SINTETIZADOS.....	74
TABELA 6 - SEGMENTOS ACESSÍVEIS DE RLID1 E SUA POSIÇÃO NA SEQÜÊNCIA.....	108
TABELA 7 – ACESSIBILIDADE DOS AMINOÁCIDOS DE LID1 PREDITOS POR MIMOP COMPARADOS AOS DE SMASE I.....	115
TABELA 8 – RESIDUOS ESTABILIZADORES DA ESTRUTURA DE TIM-BARRIL DE SMASE I	118

ABSTRACT

In the present study the recombinant form (rLiD1) of a dermonecrotic protein from the Brazilian *Loxosceles intermedia* spider venom was expressed in *Escherichia coli* and purified by reversed-phase HPLC. Twenty five mg of rLiD1 was produced from liter of bacterial culture. The molecular weight of rLiD1 was verified by mass spectrometry (32,758 Da). rLiD1 displayed dermonecrotic and platelet aggregation activities. However, very low sphingomyelinase D and complement-dependent haemolytic activities were observed. Immunized BALB/c mice with rLiD1 developed an antibody response that reacted by ELISA with *L. intermedia* crude venom and cross-reacted with *L. gaucho* and *L. laeta* whole venoms. *In vivo* protection assay showed that 75% of the immunized mice resist to the challenge by 2.5 LD₅₀ of *L. intermedia* venom (25 µg). To characterize epitopes associated with protective antibodies, we prepared synthetic 15 mer overlapping peptides covering the complete amino acid sequences of the LiD1. Immunoassays revealed one antigenic region in the N-terminal of the molecule. The amino acid sequence of this epitope was found in other dermonecrotic proteins and some of its residues have been implicated with the active site of the toxin. This epitope was synthesized and used to raise antibodies in rabbits. Anti-peptide antibodies showed reactivity with rLiD1 and with *L. intermedia* whole venom and induced protections against dermonecrotic activity. Analysis with anti-*Loxosceles* serum (CPPI) revealed six different epitope regions. One epitope representative of each region was synthesized and utilized as antigenic mixture to immunize rabbits. Anti-peptides antibodies protect *in vitro* and *in vivo* dermonecrotic activity of rLiD1 at order of 80% and 60%, respectively. Therefore, antibodies against rLiD1 neutralized 100% of this activity. To evaluate the cross reactivity of anti-rLiD1 rabbit antibodies against others *L. intermedia* proteins, overlapping peptides of five proteins from dermonecrotic family (LiRecDT2, LiRecDT4, LiRecDT5, Loxtox *i5*, Loxtox *i7*) were synthesized. Anti-rLiD1 antibodies cross-react with all of them, showing two conserved regions. One of these regions was also found in Smasel of *L. laeta* venom. Thirty-five continuous peptides mimicking discontinuous regions of rLiD1 were designed by using the bioinformatic tool PEPOP and prepared by Spot synthesis. Antibodies anti-rLiD1 recognized one discontinuous-continuous region. As conclusion, we can suggest that the use of synthetic peptides can be a good approach for anti-venom development.

Keywords: synthetic peptides, recombinant protein, *Loxosceles venom*, anti-venom.

RESUMO

Neste trabalho realizamos a expressão e purificação de uma proteína com atividade dermonecrotica da aranha *Loxosceles intermedia* denominada rLiD1. Obtivemos um rendimento de 25, 8 mg de proteína por litro de cultura bacteriana. A massa de rLiD1 (32, 758Da) foi obtida por espectrometria de massas. Esta proteína apresentou também atividade de agregação plaquetaria. No entanto, apresentou uma pequena atividade hemolítica e esfingomielinásica. Camundongos Balb/c imunizados com rLiD1 foram capazes de produzir anticorpos que reagiram por ELISA com o veneno de *L. intermedia* e apresentaram reatividade cruzada com os venenos de *L. gaucho* e *L. laeta*. Ensaio de proteção *in vivo* mostraram que 75% dos camundongos imunizados com rLiD1 foram capazes de resistir ao desafio com 2.5 DL₅₀ do veneno de *L. intermedia* (25 µg). Com o objetivo de caracterizar os epítopos relativos aos anticorpos protetores, preparamos peptídeos de 15 aminoácidos sobrepostos cobrindo a estrutura primária de rLiD1. Imunoensaios com esses peptídeos mostraram-nos uma região antigênica na extremidade N-terminal da molécula. Esse epítopo foi sintetizado e utilizado como imunógeno em coelhos. Anticorpos anti-peptídeos mostraram reatividade com rLiD1 e com o veneno de *L. intermedia* e foram também capazes de induzirem proteção contra a atividade dermonecrotica. Os peptídeos sobrepostos foram também analisados frente ao soro anti-*Loxoscelico* (CPPI), revelando-nos 6 diferentes regiões epitópicas. Um epítopo representativo de cada região foi sintetizado e utilizados como uma mistura antigênica para imunizar coelhos. Anticorpos anti-peptídeos foram capazes de proteger a atividade dermonecrotica induzida por rLiD1 *in vitro* e *in vivo* cerca de 80% e 60%, respectivamente. Por outro lado, anticorpos anti-rLiD1 foram capazes de neutralizar 100% desta atividade. A fim de avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos anti-rLiD1 frente a outras proteínas da família das dermonecroticas, do veneno de *L. intermedia* (LiRecDT2, LiRecDT4, LiRecDT5, Loxtox i5, Loxtox i7), peptídeos sobrepostos baseados em suas sequências primárias foram sintetizados. Anticorpos anti-rLiD1 apresentaram reatividade com todas estas proteínas e reconheceram duas regiões comuns. Uma dessas regiões foi também encontrada em SMase I, do veneno de *L. laeta*. Além disso, 35 peptídeos contínuos mimetizando regiões descontínuas de rLiD1 foram desenhados utilizando o programa de bioinformática PEPOP. Estes peptídeos foram sintetizados e anticorpos anti-rLiD1 reconheceram uma dessas regiões contínuas-descontínuas. Como conclusão deste trabalho, sugerimos a possibilidade do uso de peptídeos sintéticos na produção de anti-venenos.

Palavras chave: peptídeos sintéticos, proteínas recombinantes, veneno de *Loxosceles*, anti-venenos.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Anualmente registra-se cerca de 5 milhões de acidentes por animais peçonhentos no mundo dos quais entre 50 e 75% requerem tratamento para prevenir a morte, amputações ou seqüelas permanentes (Organização Pan-Americana de Saúde, 2007).

Estes acidentes representam sérios problemas de saúde pública no Brasil (Ministério Da Saúde, 1990) sendo notificados anualmente mais de 50.000 acidentes (Ministério da Saúde, 1998). Este alto número de casos é devido à existência de diferentes gêneros e espécies peçonhentas. Serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*, escorpiões do gênero *Tityus*, aranhas dos gêneros *Ladrodectus*, *Loxosceles*, *Lycosa* e *Phoneutria* e insetos do gênero *Apis* são comumente encontrados.

De acordo com Vetter e Visscher (1998), 75 % de todas as espécies de animais do mundo são de artrópodes. Dentre os artrópodes, as aranhas do gênero *Loxosceles*, também conhecidas como aranhas marrom, constituem a terceira causa de acidentes por animais peçonhentos no Brasil, sendo que a maioria destes ocorre no estado do Paraná, com 6317 casos registrados neste Estado, no ano de 2007 (Sinan, 2007).

Os acidentes com as espécies *Loxosceles gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* são os mais abundantes e de importância médica no Brasil (Cardoso, Wen *et al.*, 1990). O principal problema decorrente do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* é o aparecimento de uma lesão dermonecrotica na pele, no local da picada. Entretanto, reações sistêmicas como hemólise, hemorragia, trombocitopenia e insuficiência renal são também observadas. As reações sistêmicas ocorrem em 16% dos casos de picadas por *Loxosceles intermedia* com uma taxa de mortalidade de 0.2% (Ribeiro *et al.*, 1993).

Ainda não foi bem estabelecida uma terapia definitiva para o tratamento do loxoscelismo (Swanson e Vetter, 2006). Até o momento não existem critérios unânimes sobre a melhor estratégia terapêutica a ser empregada, com grandes controvérsias sobre a efetividade das drogas, do soro antiveneno e da associação entre eles.

Além do interesse científico na busca de terapia e diagnóstico despertado pelos vários efeitos clínicos dos acidentes loxoscélicos, as toxinas de venenos animais são alvo de estudos que visam ao desenvolvimento de bioinseticidas (De Castro, Silvestre *et al.*, 2004),

de novas drogas terapêuticas (Smith e Vane, 2003) e de ferramentas farmacológicas (Isbister e White, 2004).

No caso de aranhas do gênero *Loxosceles*, a obtenção de um grande número de aranhas para extração de veneno é difícil, fato que dificulta o estudo de seus componentes.

Desta maneira, os usos de técnicas de clonagem e expressão gênica permitem uma obtenção em larga escala de alguns dos componentes desses venenos.

Assim sendo, este trabalho visa à produção de uma proteína dermonecrótica ativa e seu estudo imunogênico, objetivando a geração de peptídeos sintéticos (não tóxicos) imunogênicos e neutralizantes da atividade dermonecrótica.

1.1 DAS ARANHAS

As aranhas são artrópodes terrestres e apresentam o corpo dividido em cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e abdome, um par de palpos, um par de quelíceras, quatro pares de patas e duas a oito fiandeiras no abdome. Todas as aranhas são carnívoras, exercendo, desta forma, um papel importante no equilíbrio ecológico como predadoras de insetos (Ruppert, 1996); (Lucas, 1988); (Jorge *et al.*, 1991).

As aranhas picam suas presas com as quelíceras, providas de glândulas de veneno que se abrem na ponta da garra, e que também servem para segurar e macerar os tecidos durante a digestão. O veneno da maioria das aranhas, provavelmente, está envolvido na paralisação de presas que na sua maioria são insetos, outros artrópodes ou pequenos vertebrados (Swanson e Vetter, 2005).

Estima-se que existam em torno de 170.000 espécies de aranhas no mundo, sendo que apenas 34000 espécies foram descritas (Coddington, 1991; Vetter e Visscher, 1998). Entretanto, apenas um pequeno número de aranhas pode causar danos em mamíferos, sendo a maior parte desses danos leves (Swanson e Vetter, 2005).

Segundo Vetter e Visscher (1998), um pequeno grupo de aranhas é considerado perigoso ao homem. Dentre elas, estão incluídas as *white-tailed*, sem muitos sintomas associados, as *six-eyed crab* que possuem um veneno muito tóxico, as *hobo* que causam lesão dermonecrótica, as *yellow sac* que levam à necrose leve, as grandes e agressivas *australian funnel-web* cuja picada causa náusea, vômito e dispnéia. No Brasil, as aranhas de maior importância médica pertencem à subordem *Araneomorphae*, que se caracterizam por apresentar ferrões inoculadores de veneno em posição horizontal. A *Loxosceles* (aranha marrom) e a *Phoneutria* (armadeira) são as principais. Também com importância médica encontram-se os gêneros *Latrodectus* (viúva-negra), *Lycosa* (aranha de grama ou tarântula) e *Mygalomorphae* (caranguejeiras)(Jorge, 1991).

As aranhas, cujas proteínas são objeto deste estudo, pertencem ao filo Artropoda, subfilo *Chelicerata*, ordem *Araneae*, subordem *Araneomorpha*, família *Sicariidae*, gênero *Loxosceles* (Platnick, 2004).

1.2 ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido descritos desde a década de 50 (Rosenfeld, 1957; Atkins, Wingo *et al.*, 1958). *Loxosceles gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* são as espécies mais abundantes e de importância médica no Brasil (Cardoso, Wen *et al.*, 1990). Essas aranhas são denominadas popularmente de aranhas marrom por apresentarem o corpo de coloração marrom-amarelada (Fig. 1A), ou de aranhas-violino por possuírem uma mancha na forma deste instrumento no cefalotórax (Fig. 1B). São pequenas, apresentam 3 pares de olhos (Fig. 1C) e medem de um a cinco centímetros de perna a perna (1 a 2 centímetros de corpo e 3 a 4 de envergadura) (Futrell, 1992).

Normalmente as aranhas do gênero *Loxosceles* não são agressivas e os acidentes acontecem quando estas se sentem ameaçadas e sem condições de fuga, ou são comprimidas contra o corpo humano em roupas de uso pessoal, de cama ou de banho e calçados. (Atkins, Wingo *et al.*, 1957); (Schenone e Reyes, 1963).

As aranhas-marrom são capazes de tolerar temperaturas que variam de 8°C a 43° C e são mais encontradas freqüentemente na primavera e no verão (Atkins, 1957; Futrell, 1992). Macho e fêmea são capazes de sobreviver até 276 dias sem água ou alimentos (Gertsch, 1983); (Futrell, 1992).

Sandidge (2003) estudando o comportamento alimentar da *L. reclusa* em 71 moradias no Estado de Kansas, Estados Unidos, constatou que estes aracnídeos desenvolveram uma preferência alimentar por presas mortas, tolerando inclusive os inseticidas.

De vida sedentária, hábitos noturnos e rápida locomoção, as aranhas-marrom vivem em locais como tijolos, madeiras e entulhos abandonados, palmeiras, cavas e pedras; no ambiente doméstico preferem locais úmidos, escuros, cheios de entulhos e não perturbados, de limpeza inadequada, onde tecem teias irregulares, semelhantes a fios de algodão (Galiano, 1967); (Gertsch, 1983); (Maretic, 1987); (Lucas, 1988); (Jorge, 1991); (Futrell, 1992); (Fischer, 1996).

(A)



(B)



(C)



Figura 1 - Morfologia das aranhas do gênero *Loxosceles*

A – Aspecto geral de uma aranha do gênero *Loxosceles*

B- Vista dorsal de *Loxosceles reclusa* mostrando o padrão de violino no cefalotórax (Vetter e Visscher, 1998).

C- Vista anterior de *Loxosceles reclusa* mostrando a configuração dos 6 olhos em 3 diades (Vetter e Visscher, 1998).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

As aranhas do gênero *Loxosceles* estão amplamente difundidas em regiões de clima temperado e tropical do mundo como na Américas Central, do Sul e do Norte, além de Europa, região Mediterrânea e África (Wasserman e Anderson, 1983); (Futrell, 1992) e até mesmo na Austrália (White J, 1995) (Figura 2).

Na América do Sul são mais de 30 espécies, no Brasil, representadas por *L. adalaida*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. hirsuta*, *L. similis*, *L. anomala*, *L. laeta* e *L. amazonica*. Na região Sul do Brasil são mais importantes do ponto de vista epidemiológico as aranhas *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (Gertsch, 1967).

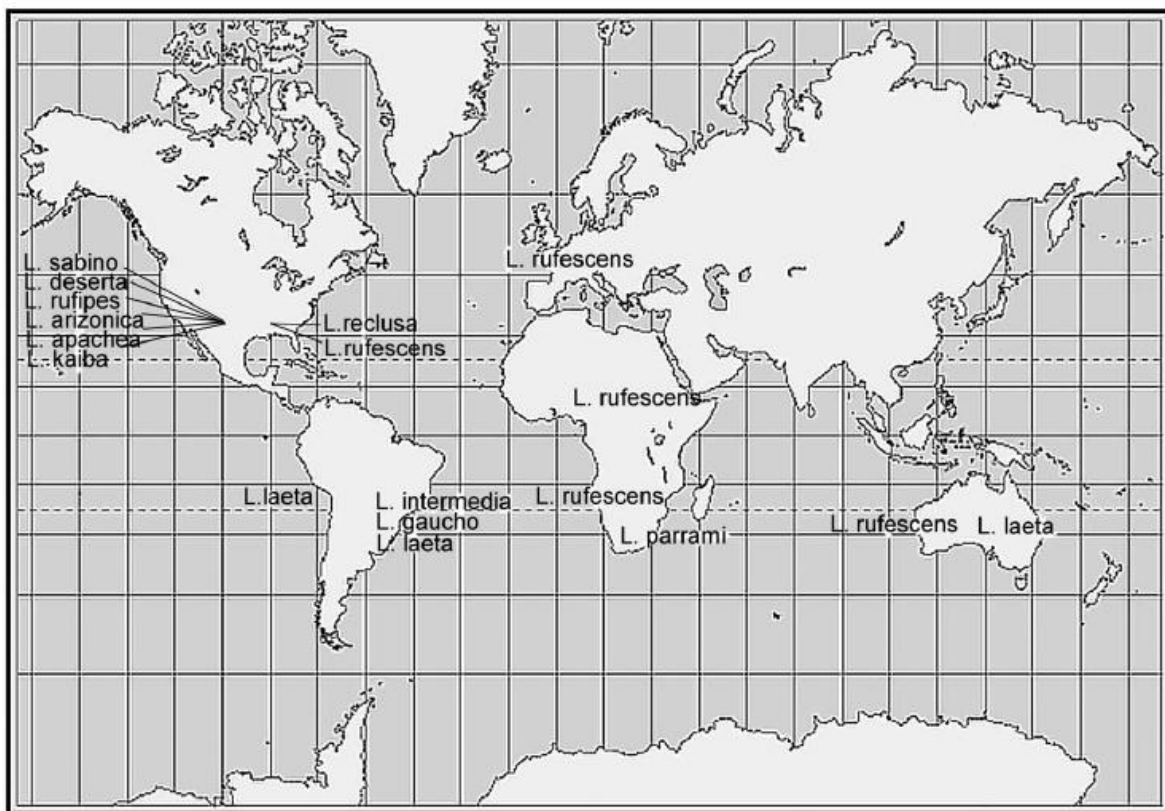


Figura 2 - Distribuição mundial de aranhas do gênero *Loxosceles* de importância médica. (Hogan, Barbaro *et al.*, 2004).

Estimulados pela elevada infestação intradomiciliar e pelo crescente número de casos ocorridos na região sul e sudeste do Brasil, principalmente no estado do Paraná e Santa Catarina, muitos estudos foram realizados com o veneno dessas aranhas. Somente entre os anos de 1989 e 1990, 77,4% de todos os casos de loxoscelismo notificados no país

ocorreram na cidade de Curitiba e região metropolitana (Ribeiro, 1993)(Figura 3). Nesta região, a espécie *L. intermedia* é predominante, sendo notificados, no ano de 2007, 6317 casos (Sinan, 2007).



Figura 3 - Número de acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* em Curitiba

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde, 2002

A maior incidência de picadas ocorre nos meses de verão, e em pacientes do sexo feminino, na faixa etária entre 10 e 50 anos e os principais locais atingidos são os membros superiores e inferiores, com índices de letalidade de até 0,2% (Ribeiro, 1993) e 0,4% (Marques Da Silva, 2002). A espécie *Loxosceles intermedia* é encontrada em 98% dos domicílios estudados contra 2% dos casos por *Loxosceles laeta* (Secretaria Municipal de Saúde, 2002).

A maioria dos acidentados leva mais de 12 horas para procurar atendimento médico já que grande parte não sente a picada. Dificilmente o paciente visualiza a aranha e menos de 10% levam a aranha no local de atendimento médico (Ribeiro, 1993).

Em Belo Horizonte, a migração desses aracnídeos para o ambiente urbano foi verificada com o recente ressurgimento de aranhas do gênero *Loxosceles* nos domicílios dos

bairros Serra e Belvedere, mais precisamente das espécies *L. similis* e *L. anomola* (Silvestre, De Castro *et al.*, 2005) antes encontradas somente em ambientes cavernícolas.

1.4 DAS GLÂNDULAS VENENÍFERAS

As glândulas veneníferas são estruturas bulbares pareadas, localizadas na cavidade cefalotorácica e se comunicam com o exterior através de dois dutos que desembocam no aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (Gajardo-Tobar, 1966; Foil, Frazier *et al.*, 1979) as quais, por sua vez, são equivalentes às mandíbulas de insetos.

A glândula de veneno da aranha *L. intermedia* é composta de duas camadas de músculo estriado, sendo uma interna e outra externa. As células epiteliais são encontradas lado a lado fazendo projeções ao lúmen que é rico em vesículas secretoras contendo veneno. A lâmina basal que separa as células epiteliais secretoras das células musculares das glândulas contém glicoproteínas, resíduos sulfatados glicosaminoglicanos, laminina e entactina (Santos, 2000).

O veneno das aranhas marrom *Loxosceles* pode ser obtido diretamente das quelíceras das aranhas vivas, das glândulas do veneno preparadas ou do cefalotórax total ou ainda de sua parte anterior contendo as glândulas. Todos estes métodos são imperfeitos uma vez que a aranha pode, voluntariamente, regular a liberação do veneno e também porque pode haver contaminação com outros constituintes, uma vez que os extratos do cefalotórax contêm muitas impurezas.

A eletroestimulação é um dos métodos mais eficazes para depletar totalmente a glândula (Geren, Chan *et al.*, 1973); (Maretic, 1987). A quantidade de veneno obtida, no entanto, varia de acordo com a espécie. Assim *L. rufipes*, por exemplo, secreta 700 µg de veneno por extração (Lucas, 1988), *L. reclusa* libera entre 65 e 100 µg de proteína em quatro microlitros, enquanto *L. intermedia* secreta entre 35 e 40 µg de veneno por extração (Forrester, Barrett *et al.*, 1978); (Tambourgi, De *et al.*, 2004).

Em estudo comparativo do veneno de machos e fêmeas de *L. intermedia*, De Oliveira e colaboradores (1999) demonstraram que o veneno produzido pelas fêmeas possui maior conteúdo protéico, maior atividade hemolítica dependente do complemento e atividade tóxica mais potente. Além disso, nas fêmeas, o veneno é produzido em maior quantidade e conseqüentemente as lesões causadas pelos acidentes com representantes fêmeas são proporcionalmente mais graves.

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO LOXOSCELISMO

Loxoscelismo é o nome dado ao conjunto de sintomas e sinais clínicos decorrentes do envenenamento causado pela picada das aranhas do gênero *Loxosceles* (Barreto, 1985); (Schenone, 1989).

A apresentação clínica do loxoscelismo se dá sob duas formas: cutânea ou dermonecrótica (aproximadamente 80% dos casos) e víscero-cutânea, com complicações que podem ser locais ou sistêmicas (Lucas, 1988); (Barreto, 1985). O desenvolvimento de um ou de outro tipo de quadro clínico está relacionado com o estado nutricional, idade, local da picada, quantidade de veneno inoculado, susceptibilidade ao veneno e tempo entre picada e início do tratamento (Gajardo-Tobar, 1966); (Barbaro, Cardoso *et al.*, 1992b).

Geralmente a picada da aranha é indolor, resultando na demora da procura do paciente ao atendimento médico o que ocorre horas depois do acidente, quando se inicia a dor local. Esta dor, que varia de leve a severa, é causada, provavelmente, pela isquemia secundária à vasoconstrição (Futrell, 1992). Sabe-se que tanto nos Estados Unidos quanto no Brasil, muitos dos casos de loxoscelismo notificados são confundidos com outras doenças cutâneas como infecção por *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, antrax cutâneo, infecções por herpes e *Varicella zoster*, picadas de insetos e até mesmo com quadros de úlcera diabética (Vetter, 2003); (Vetter, Cushing *et al.*, 2003); (Gubert, 2005).

Nos casos de loxoscelismo cutâneo (Futrell, 1992), inicialmente, surge na região atingida um eritema cujo centro emerge uma mácula equimótica. Com o passar das horas ou dias, a lesão adquire um aspecto que é denominado de placa marmórea (Figura 4A) e, também pode ocorrer a formação de vesículas e bolhas de conteúdo hemorrágico (Futrell, 1992); (Sezerino, Zannin *et al.*, 1998). Raramente há febre que, quando ocorre, é um sintoma precoce. No final da primeira ou segunda semana de progressão da lesão, muitas vezes, a área necrótica se torna bem delimitada, formando-se, então, uma crosta negra (Figura 4B) que, à medida que seca, diminui de tamanho. No local forma-se uma úlcera de proporções variáveis que, freqüentemente, atinge a hipoderme. Como seqüela, no local da lesão, permanece uma cicatriz que pode ser desfigurante ou até mesmo causar prejuízo funcional.

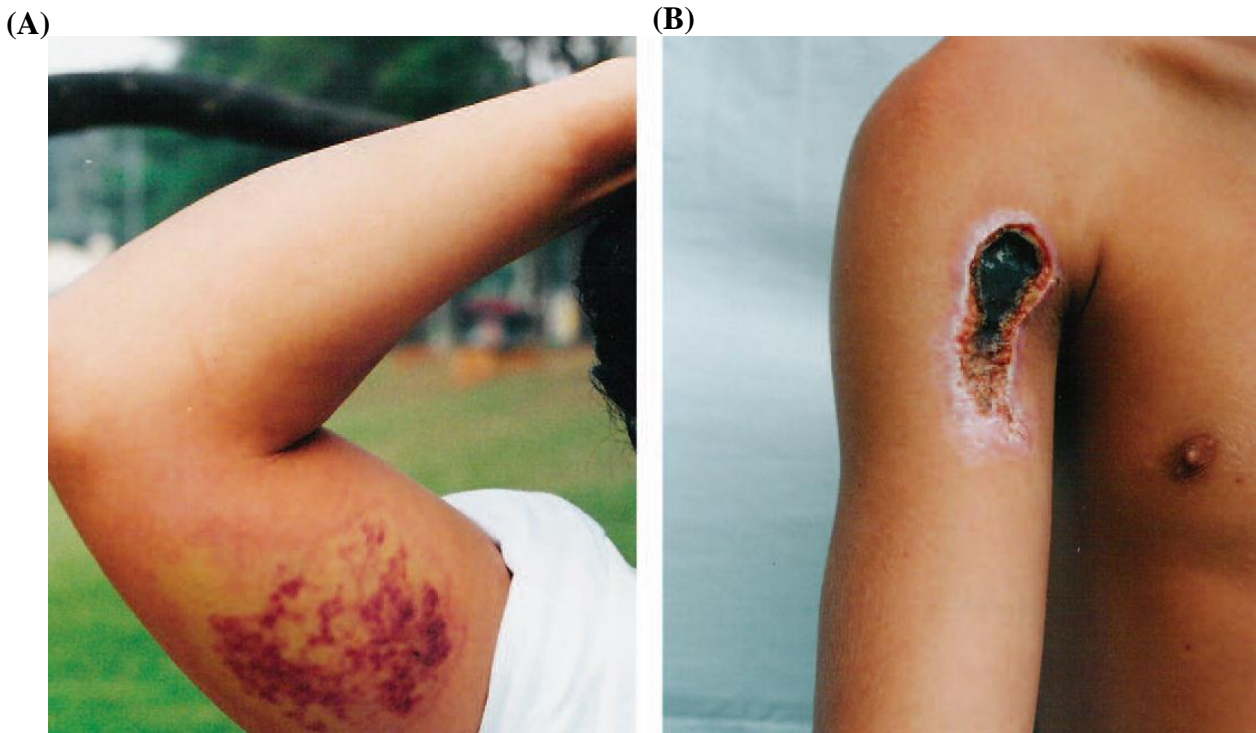


Figura 4- Quadro de loxoscelismo

(A) Placa marmórea – edema e eritema com áreas de equimose e hemorragia- observada 48 horas após a picada. (B) Área dermonecrotica característica de um paciente mediante tratamento e 26 dias após a provável picada (Hogan *et al.*, 2004).

O loxoscelismo cutâneo-visceral, tipo mais raro, ocorre entre 3 (Cardoso J.L.C, 1988) a 13% (Sezerino, Zannin *et al.*, 1998) dos casos. É desencadeado horas ou dias após a picada e é caracterizado por distúrbios hematológicos como coagulação intravascular disseminada, anemia hemolítica e trombocitopenia, culminando com a insuficiência renal. Exames laboratoriais podem indicar hemoglobinemia, bilirrubina elevada, hemoglobinúria, leucocitose e proteinúria (Futrell, 1992). O óbito não é freqüente, podendo ser de 0,2% (Ribeiro, 1993), 0,4% (Cardoso *et al.*, 1988) ou de 1,5% (Sezerino, Zannin *et al.*, 1998).

1.6 TOXINAS

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* é essencialmente protéico, este conteúdo possui ação enzimática ou tóxica, podendo ser comparado a alguns venenos de serpentes, onde os estudos demonstraram a presença abundante de enzimas em sua composição (Martinez-Vargas, 1987). Entre elas estão a fosfatase alcalina, a 5' ribonucleotídeo fosfohidrolase e a hialuronidase identificadas no veneno da *L. reclusa*, sendo que nenhuma delas produz lesão dermonecrótica em animais de laboratório (Futrell, 1992).

O veneno de *L. intermedia* possui proteínas na faixa de 5 a 850 kDa, sendo que as de 5 a 40 kDa são predominantes e as de 60 a 850 kDa pouco expressas (Veiga, Da Silveira *et al.*, 2000). A toxina mais bem caracterizada bioquimicamente é a esfingomielinase D (32 kDa) envolvida na agregação plaquetária, hemólise intravascular e dermonecrose (Kurpiewski, Campbell *et al.*, 1981); (Kurpiewski, Forrester *et al.*, 1981); (Futrell, 1992). O veneno contém ainda metaloproteases (Feitosa, Gremski *et al.*, 1998); (Da Silveira, Wille *et al.*, 2007) e serinoproteases (Veiga, Da Silveira *et al.*, 2000).

Essa diversidade de toxinas contribui para a toxicidade do veneno. Recentemente, uma análise do transcriptoma de *L. laeta* usando ESTs, mostrou que a glândula destas aranhas possui como transcrito mais abundante, a esfingomielinase D, já relatada como a principal causadora dos efeitos locais e sistêmicos advindos do envenenamento loxoscélico. Além dela, transcritos correspondentes a metaloproteases, serinoproteases, hialuronidases, lipases, C-lectinas, cisteino peptidases e inibidores, nucleotidases, quitinases e neurotoxinas (Fernandes-Pedrosa, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2008) foram encontrados.

1.7 MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO

Os mecanismos de ação do veneno das aranhas marrom apresentam inúmeras variáveis, desde toxinas diversas até tamanho, sexo e idade das aranhas, quantidade de veneno inoculada no acidente e estado geral do hospedeiro (De Oliveira, Goncalves De Andrade *et al.*, 2005); (Goncalves De Andrade, De Oliveira *et al.*, 1999).

Estudos com o veneno de *L. reclusa* demonstraram que este veneno é capaz de ativar componentes do complemento no plasma (Kniker, Morgan *et al.*, 1969); (Kurpiewski, Campbell *et al.*, 1981); (Morgan, Morgan *et al.*, 1978) (Figura 5E). Na mesma época, Forrester e colaboradores (1978) determinaram que um componente hemolítico

parcialmente purificado do veneno de *L. reclusa* possuía também, atividade esfingomielinase D. Em 1981, foi também demonstrado o papel desta toxina como agregadora de plaquetas (Kurpiewski, Forrester *et al.*, 1981) (Figura 5A).

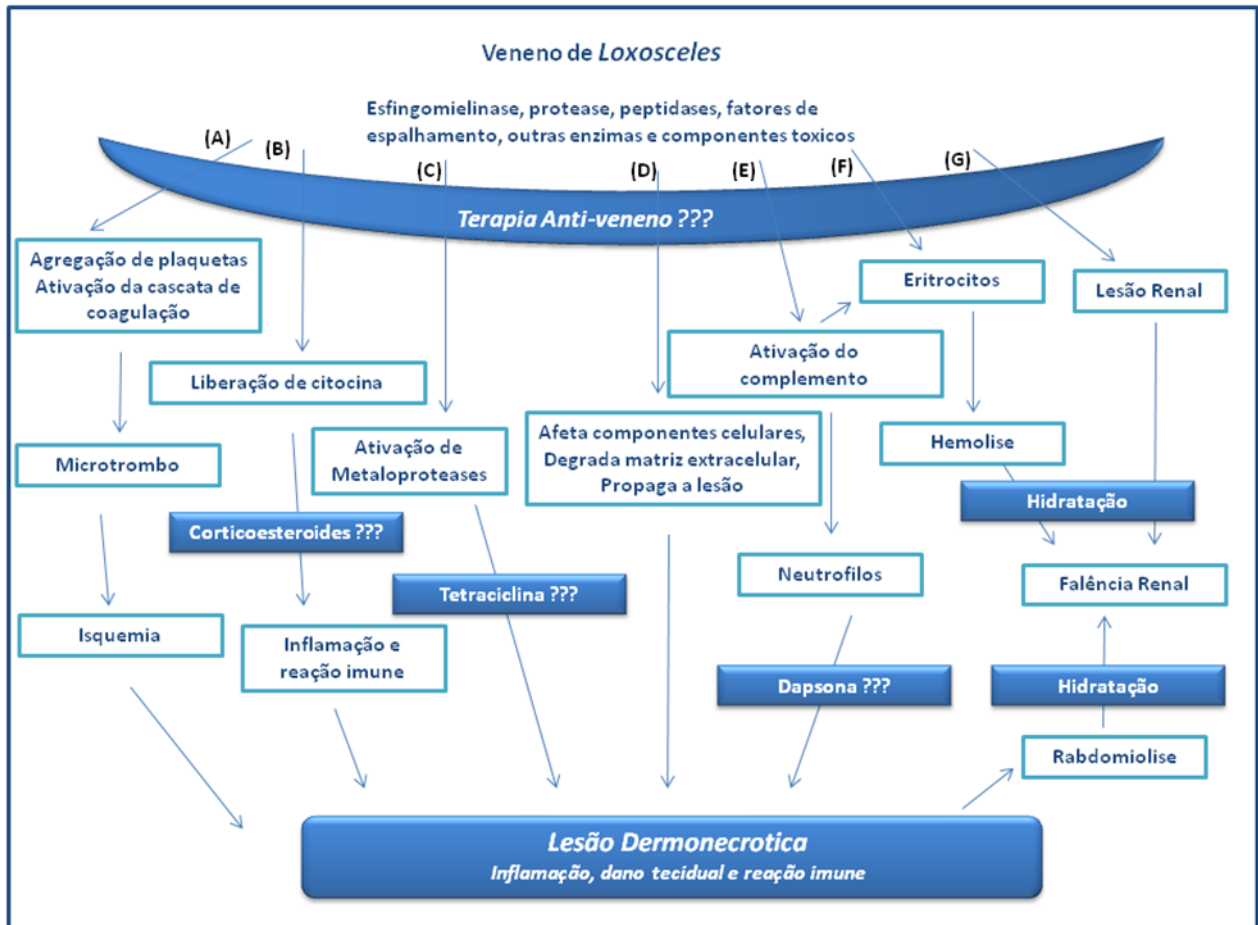


Figura 5- Proposto mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e opções de tratamento. (Adaptado de Hogan, Barbaro *et al.*, 2004).

Da década de 80 até hoje muitos avanços foram realizados no estudo das toxinas integrantes do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, principalmente das que apresentam atividade esfingomielinase D.

Assim sendo, o grupo de Barbaro (2005) verificou a existência de atividade esfingomielinase D em 5 venenos de *Loxosceles* estudados. Da mesma maneira, Binford e Wells (2003) detectaram esfingomielinases D em 10 espécies de *Loxosceles* da América do Norte e África.

1.7.1 Ativação do sistema do complemento

Foi verificado que a proteína de 35 kDa purificada a partir do veneno total da *L. intermedia* atua sobre a superfície de eritrócitos humanos ativando o sistema do complemento (Fig. 5E e 5F) tanto pela via clássica quanto pela via alternativa (Tambourgi, Magnoli *et al.*, 1995); (Tambourgi, Magnoli *et al.*, 1998); (Tambourgi, De Sousa Da Silva *et al.*, 2002).

A toxina não age diretamente induzindo a lise eritrocitária, mas aumenta a susceptibilidade da célula à lise mediada por complemento. Fato este que é provocado pela clivagem de glicoforinas da superfície celular e inibido por inibidores das metaloproteinases endógenas (Tambourgi, Morgan *et al.*, 2000). Acredita-se que a via clássica seja ativada através da perda de assimetria da célula e da exposição de fosfatidilserinas da membrana, resultado da ação da esfingomielinase presente no veneno (Tambourgi, De Sousa Da Silva *et al.*, 2002).

Ao investigarem os efeitos das toxinas do veneno de *Loxosceles* sobre células endoteliais, o grupo de Van Den Berg e colaboradores (2002) verificaram que houve indução de clivagem de uma proteína co-fator de membrana reguladora de complemento (MCP) e do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) da superfície celular por ativação metaloproteinases da família das adamalinas, o que demonstra o efeito indireto do veneno sobre a lise celular e não um efeito proteolítico. Curiosamente, a clivagem de MCP aumenta a resistência à lise induzida pelo complemento provavelmente devido ao aumento da fluidez da membrana dificultando a inserção do complexo de ataque à membrana.

Tambourgi e colaboradores (2005) sugerem que a destruição tecidual e dano ao colágeno e fibras musculares pode iniciar a ativação da via clássica do complemento, resultando na formação de C5a e a geração do complexo de ataque a membrana (MAC).

Estudos subsequentes realizados pelo mesmo grupo mostraram que a modificação na superfície de eritrócitos provocada pela SMASE D permite a ligação direta de C1q na membrana e o início da cascata do complemento (Tambourgi, Pedrosa *et al.*, 2007).

1.7.2 Ativação de Metaloproteases

Além da participação do complemento na patogênese do loxoscelismo, a indução da expressão de uma gelatinase endógena, identificada como metaloproteinase 9 (MMP-9), em

neutrófilos, pela SMase (Tambourgi, Paixao-Cavalcante *et al.*, 2005) parece ser também de grande importância no desenvolvimento da lesão (Figura 5C). Foi observado um aumento da expressão e secreção de MMP-2 e MMP-9 em fibroblastos e queratinócitos de coelho, o que está associado à morte celular (Paixao-Cavalcante, Van Den Berg *et al.*, 2006).

Recentemente, Tambourgi e colaboradores verificaram que tanto o veneno de *Loxosceles* quanto a toxina purificada reduzem a expressão de trombosmodulina e do receptor de proteína C, na superfície de células endoteliais, mediado pela ativação das metaloproteases endógenas. Este fenômeno pode resultar na redução da ativação da proteína C – principal anticoagulante fisiológico- mediada pela trombina (Van Den Berg, Goncalves-De-Andrade *et al.*, 2007).

1.7.3 Bioquímica

As esfingomielinases D são enzimas que catalisam a hidrólise de esfingomielina, presente em membranas celulares, em fosforilcolina e ceramida 1-fosfato (Hannun e Obeid, 1995; Goni e Alonso, 2002). Ao contrário da geração de ceramida 1-fosfato pela ação das esfingomielinases D, as esfingomielinases endógenas de mamíferos geram ceramida (Ballou, Lauderkind *et al.*, 1996). As ceramidas regulam a produção de TNF- α que causa adesão de leucócitos nas células endoteliais dos vasos, estimulando estas e macrófagos a secretarem interleucinas, especialmente IL-8, fator quimiotático mais importante para neutrófilos (Domingos, Tynan *et al.*, 2003). No entanto, o veneno de *L. gaucho* não foi capaz de induzir a produção de TNF- α em macrófagos murinos, o que foi visto apenas quando o veneno foi combinado com esfingomielina (Domingos, Tynan *et al.*, 2003).

O grupo de Van Meeteren (2004) verificou que a Smase D hidrolisa a lisofosfatidilcolina ou LPC (1-o-hexadecilglicero- 3-fosfocolina), um importante componente do plasma, a um composto alquilado, o ácido lisofosfatídico ou LPA. Este ácido quando em concentração anormal no sangue pode causar coagulação intravascular e infiltração de neutrófilos.

Chaim e colaboradores (2006) mostraram que a mesma proteína causadora de dermonecrose é responsável também por efeitos sistêmicos, como lesão renal direta (Figura 5G).

1.7.4 Outros fatores envolvidos no desenvolvimento da lesão

Como o veneno total de *Loxosceles* possui outros componentes além da esfingomielinase D, possivelmente o processo seja multifatorial, já que envolve além da ação direta do veneno sobre as células e matriz extracelular (Figura 5D), a liberação de interleucinas (Figura 5B) e um sinergismo com a esfingomielinina endógena resultando na lesão dermonecrótica.

Feitosa e colaboradores (1998) descreveram metaloproteínases no veneno de *Loxosceles intermedia* que degradam fibronectina e fibrinogênio (loxolisina A) e gelatina (loxolisina B) sugerindo a participação no processo dermonecrótico. Serinoproteases (85 kDa e 95 kDa) foram também detectadas, porém, sem ação sobre lâmina e fibrinogênio, postulando que estas serinoproteases poderiam complementar o efeito iniciado por outras proteases do veneno ou até por proteases liberadas por células ativadas pelo veneno (Veiga, Da Silveira *et al.*, 2000). Além destas proteases, recentemente, uma metaloprotease semelhante a astacina foi clonada e caracterizada a partir da glândula de *L. intermedia* (Da Silveira, Wille *et al.*, 2007).

A hialuronidase é, provavelmente, a responsável parcial pelo espalhamento gravitacional da lesão cutânea (Foil, Frazier *et al.*, 1979). Acredita-se que a atividade hialuronidase em conjunto com enzimas proteolíticas e esfingomielinásicas proporcionam o favorecimento das injúrias teciduais (Barbaro, Knysak *et al.*, 2005).

1.8 PATOLOGIA RELACIONADA AO LOXOSCELISMO

Estudos histopatológicos incluem espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, infiltração de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração das paredes dos vasos sanguíneos e hemorragia dermo e subcutânea. O acúmulo de células polimorfonucleares é especialmente marcante e o abscesso pode ocorrer em 3 a 5 dias (Futrell, 1992).

Análises histopatológicas em coelhos, modelo animal que melhor representa a dermonecrose (Furlaneto, 1962), mostraram que durante as primeiras quatro horas, são evidenciados edema, hemorragia, degeneração dos vasos sanguíneos, exsudação, trombose, acúmulo de células polimorfonucleares (PMN) nas vênulas ao redor da lesão e intensa

diapedese como mostram estudos histopatológicos realizados em experimentos animais (Ospedal, Appel *et al.*, 2002); (Tavares, Sousa-E-Silva *et al.*, 2004).

As toxinas do veneno de *L. intermedia* agem sobre as células endoteliais alterando a sua morfologia e provocando a perda de sua adesão em garrafas de cultura. Além disso, *in vivo*, essas toxinas clivam proteoglicanos, heparan sulfato e degradam entactinas (Veiga, Zanetti *et al.*, 2001); (Patel, Modur *et al.*, 1994) observaram que o veneno de *L. reclusa* ativa célula endotelial, estimulando-a a liberar mediadores e assim passando a atrair neutrófilos que após a adesão, liberam o conteúdo lítico de seus grânulos (Figura 5B).

Em um estudo sobre as alterações sofridas pela medula óssea e sangue periférico de animais em teste, demonstrou-se que, embora transitoriamente, ocorre depressão medular provavelmente acarretada pela intensa migração de plaquetas e neutrófilos (Da Silva, Hashimoto *et al.*, 2003).

1.9 DIAGNOSTICO E TRATAMENTO

Mesmo com o desenvolvimento de imunoenaios para a detecção (Gomez, Krywko *et al.*, 2002), identificação e quantificação do veneno em tecido necrosado (Cardoso J.L.C, 1988; Cardoso, Wen *et al.*, 1990), em soro (Chavez-Olortegui, Zanetti *et al.*, 1998) e em pêlos da lesão (Miller, Gomez *et al.*, 2000; Krywko e Gomez, 2002) de pacientes acidentados, o diagnóstico do loxoscelismo ainda depende do reconhecimento do acidente pelo próprio paciente quando o mesmo traz a aranha ao centro médico ou pelo desenvolvimento do quadro clínico e das características da lesão (Málaque, 2002). E por isso, o erro no diagnóstico do loxoscelismo é muito comum, o que pode levar a sérias conseqüências dependendo do tratamento administrado (Swanson e Vetter, 2005).

Em relação ao tratamento, vários tipos de terapias já foram propostas e testadas para o envenenamento loxoscélico. No entanto as pesquisas são inconclusivas e as ações terapêuticas são variáveis nos diferentes países (Pauli, Puka *et al.*, 2006).

Têm sido utilizados prednisona ou dapsona (Figura 5E) via sistêmica (Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004) além de anti-histamínicos (Schenone, 2003). Os analgésicos aliviam a dor e os anti-sépticos e antibióticos ajudam a prevenir a infecção secundária (Rees *et al.*, 1987).

Além dos medicamentos, os médicos aconselham repouso, compressas geladas para

minimizar a inflamação, inibir a atividade enzimática e a migração gravitacional (Sams, Dunnick *et al.*, 2001).

Quando se inicia o quadro cutâneo-visceral a hidratação (Figura 5F e 5G) precoce deve ser iniciada para prevenir a insuficiência renal, mas se a diurese não ocorrer, uma pequena concentração de manitol ou furosemida é administrada. Se os exames laboratoriais indicarem insuficiência renal o paciente é tratado em unidade de terapia intensiva onde é realizada a hemodiálise (Jorge, 1991).

Embora o tratamento com esteróides sistêmicos (Figura 5B) esteja disponibilizado eles não diminuem significativamente a infiltração de PMN ou o tamanho da lesão em experimentos animais (Futrell, 1992).

Recentemente, Paixao-Cavalcante e colaboradores (2007) demonstraram uma redução significativa da lesão dermonecrotica em coelhos após o uso tópico do antibiótico tetraciclina (Figura 5C) que é sabidamente um inibidor de metaloproteases, sugerindo seu potencial como agente terapêutico no loxoscelismo cutâneo.

Na América do Sul, a considerável morbidade e mortalidade dos acidentes loxoscélicos levou ao desenvolvimento e uso de terapia específica com antivenenos, em lesões cutâneas graves ou na presença de doença sistêmica (Ministério da Saúde, 2001); (Hogan, Barbaro *et al.*, 2004). De todas as intervenções propostas, o antiveneno vem sendo citado como a terapia de maior potencial, se administrado nas primeiras horas após o (Rees, Shack *et al.*, 1981); (Futrell, 1992); (Gomez, Miller *et al.*, 1999); (Hogan, Barbaro *et al.*, 2004).

O soro anti-loxoscélico mostrou-se eficaz diminuindo a mortalidade de crianças acidentadas (Isbister, 2003) porém, deve ser utilizado o mais precocemente possível, pois sua eficácia é diminuída quanto maior for o espaço de tempo entre o acidente e a administração do soro (Rees, 1987); (Barbaro, Cardoso *et al.*, 1992a), tendo em vista que, uma vez tendo o processo inflamatório se instalado, a lesão parece evoluir independente do agente causal (Goyffon, 2002). Para a utilização da soroterapia tardiamente, deve-se considerar que 6,5% (Sezerino, Zannin *et al.*, 1998) a 20% (Pinhati H.M.S., 1999) dos pacientes apresentam reações adversas à administração do mesmo. Mesmo tendo-se constatado a eficiência do tratamento com antivenenos, seu emprego na terapia depende da experiência dos médicos locais, pois no estado do Paraná utiliza-se o soro em 11,9% dos casos contra 70% no estado de São Paulo (Ministério da Saúde, 2001).

1.10 ANTIVENENOS E ANTICORPOS

O soro anti-loxoscélico desenvolvido por Vellard em 1954 passou a ser produzido no Brasil a partir da década de 60 (Furlaneto, 1962) e, atualmente, são disponibilizados pelo Ministério da Saúde dois antivenenos: os soro anti-loxoscélico e o soro anti-aracnídico. O soro anti-loxoscélico é o soro poliespecífico produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI), Brasil, contendo anticorpos contra os venenos das três espécies de aranhas *Loxosceles* mais importantes do ponto de vista médico no Brasil: *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*. O soro anti-aracnídico (AAS), do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, é produzido a partir de venenos de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus*. Além desses, existem dois outros produtores comerciais de antivenenos loxoscélico, o Instituto Nacional de Saúde de Lima, no Peru, e o Instituto Bioclon, no México (Hogan, Barbaro *et al.*, 2004).

Alguns estudos mostram a diferença na neutralização evocada pelo AAS e pelo soro anti-loxoscélico. Braz e colaboradores (1999) viram que o AAS mostrou-se menos eficiente na neutralização, tanto letal como dermonecrótica, do veneno de *L. intermedia* que o soro antiloxoscélico utilizando-se exclusivamente este veneno como antígeno. Por outro lado, o grupo de Barbaro (2005) mostrou uma mesma eficácia quanto à neutralização dermonecrótica e esfingomielinásica de ambos os antivenenos, até mesmo frente aos venenos de *L. deserta* e *L. reclusa*.

Vários trabalhos demonstraram que os componentes do veneno das aranhas-marrom são imunogênicos e os anticorpos produzidos neutralizam sua ação (Braz, Minozzo *et al.*, 1999); (Furlaneto, 1962); (Gomez, Miller *et al.*, 1999).

Anticorpos policlonais reconhecem e reagem cruzadamente com os venenos de diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (Gomez, Miller *et al.*, 2001) ao passo que os anticorpos monoclonais se mostram altamente específicos e se apresentam como uma alternativa à soroterapia heteróloga, se produzidos em larga escala (Alvarenga, Martins *et al.*, 2003), pois além da especificidade, também são mais estáveis e apresentam maior grau de pureza (Guilherme, Fernandes *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que os antígenos correspondentes a proteínas de 32-35 kDa (esfingomielinase D) são os componentes mais imunogênicos do veneno e mostram intensa

reatividade cruzada quando soros espécie-específica são utilizados (Barbaro, Eickstedt *et al.*, 1994b); (Barbaro, Ferreira *et al.*, 1996).

Assim sendo, a capacidade de anticorpos policlonais contra a proteína dermonecrótica em neutralizar a atividade letal e dermonecrótica do veneno total de *L. intermedia* (Rees, Shack *et al.*, 1981); (Guilherme, Fernandes *et al.*, 2001) indica o potencial desta proteína para a produção de antivenenos específicos.

Kalapothakis e colaboradores (2002) clonaram uma proteína dermonecrótica, pertencente ao grupo citado acima que após experimentos de vacinação foi capaz de induzir proteção, em camundongos BALB/c e em coelhos, contra o veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (Araujo, Castanheira *et al.*, 2003; Felicori, Araujo *et al.*, 2006).

Outros grupos também mostraram a eficácia do uso de proteínas recombinantes na produção de antivenenos neutralizantes (Tambourgi, De *et al.*, 2004); (Olvera, Ramos-Cerrillo *et al.*, 2006).

Entretanto, alguns problemas permanecem para serem resolvidos. Inicialmente, proteínas nativas ou recombinantes ativas são muito tóxicas para serem utilizadas em experimentos de imunização dos animais, para a produção dos antivenenos.

Uma estratégia diferente de trabalho seria a utilização de peptídeos sintéticos, não tóxicos, previamente definidos da estrutura primária de proteínas tóxicas.

1.11 PEPTÍDEOS E EPITOPOS

Várias razões justificam a substituição de proteínas por peptídeos que a representem. Primeiramente, a purificação de proteínas ou complexos protéicos é difícil. E mesmo, se estas estão purificadas, elas podem ainda não estarem na conformação tridimensional correta. Daí, a vantagem dos peptídeos, considerando sua facilidade de produção, conservação e sua integridade. Um peptídeo é muito menor e mais flexível que uma proteína. Sua síntese é barata, simples e fácil de ser monitorada quanto à sua qualidade. Os peptídeos são quimicamente estáveis, não são infecciosos e nem tóxicos.

Dada a sua facilidade de obtenção, inúmeros trabalhos vêm surgindo utilizando peptídeos sintéticos para diferentes fins. Só em 2008, diversos trabalhos de revisão enfocam nas aplicações de peptídeos sintéticos. Esses peptídeos têm sido utilizados como inibidores de doenças alérgicas (Kinyanjui e Fixman, 2008), no desenvolvimento de biomateriais (Cen,

Liu *et al.*, 2008) como drogas terapêuticas em doenças cardiovasculares (Desai, Sajjad *et al.*, 2008), como anti-inflamatórios (Romani, Zelante *et al.*, 2008), no tratamento de doenças auto-imunes (Mozes, Sela *et al.*, 2008), (Oshima, Deitiker *et al.*, 2007), como adjuvantes (Moyle e Toth, 2008), no tratamento de distúrbios de coagulação (Castaman, 2008) como agentes anti-microbianos (Matyus, Kandt *et al.*, 2007), em doenças reumáticas (Kessenbrock, Raijmakers *et al.*, 2007), como ferramentas de estudo em diferentes campos da biologia (Berger e Alkhatib, 2007; Johnson, Shepherd *et al.*, 2007); (Clerico, Maki *et al.*, 2008)), em biologia sintética (Bromley, Channon *et al.*, 2008) e até mesmo no estudo da diferenciação e renovação de células tronco (Schugar, Robbins *et al.*, 2008).

Dentre as diversas utilidades dos peptídeos sintéticos, diversos trabalhos vêm mostrando seu uso na produção de anti-soros e vacinas (Coligan, Tam *et al.*, 2001), (Grant, 2003), (Carter, 2003), (Belshe, Edwards *et al.*, 2007); (Ovsyannikova, Johnson *et al.*, 2007).

Para uma vacina ser efetiva, ela precisa desencadear uma forte resposta tanto de células B, quanto de células T. Por isso, para a escolha de peptídeos com potencial vacinal, o mapeamento de epitopos é de fundamental importância (De Groot, 2006).

Epitopo é definido como um grupo de aminoácidos derivado de um antígeno protéico que interagem com receptores de células B (imunoglobulinas) ou com receptores de células T, resultando na ativação de uma resposta imune (De Groot, 2006).

A primeira resolução por cristalografia de raio X de um complexo antígeno – anticorpo mostrou que um epitopo é composto de cerca de 10 a 20 aminoácidos, o que foi confirmado por diversos estudos subseqüentes (Amit, Boulot *et al.*, 1985); (Amit, Mariuzza *et al.*, 1986); (Colman, Laver *et al.*, 1987); (Sheriff, Silverton *et al.*, 1987); (Tulip, Varghese *et al.*, 1992).

A análise de 103 epitopos revelou que na maioria dos epitopos contínuos, somente 4 a 5 resíduos são implicados na energia de ligação e determinam sua especificidade, enquanto que os outros resíduos que podem ser substituídos por outros, desempenham um papel de espaçador (Geysen, Mason *et al.*, 1988).

Somente após 1982 que métodos para a localização sistemática de epitopos começaram a ser desenvolvidos e empregados. Atualmente, estes métodos englobam diferentes domínios do conhecimento, como a biofísica, a bioquímica, a biologia molecular e até mesmo a síntese química (Meloan, Puijk *et al.*, 2000). Mas, a localização experimental destes epitopos é ainda hoje um processo difícil e complexo. A utilização de peptídeos

representativos de antígenos protéicos combinada a análise através de ferramentas de bioinformática é uma alternativa interessante e promissora.

Toda a superfície acessível de uma proteína é tida como potencialmente antigênica. Portanto, as proteínas são formadas de um mosaico de epitopos virtuais. É uma tarefa difícil estimar o número de epitopos que uma proteína apresenta, pois esse número depende da existência de anticorpos contra várias regiões da proteína. A diversidade de epitopos reconhecidos em um mesmo antígeno ao longo da resposta imunológica é um fator essencial para a eficácia da resposta do anticorpo que levará à neutralização ou destruição do patógeno (Revillard, Adorini *et al.*, 1998).

Epitopos podem ser segmentos contínuos na seqüência primária da proteína, os chamados epitopos lineares, ou serem compostos por uma região na superfície tridimensional da proteína, os chamados epitopos conformacionais.

O epitopo de células B é definido como uma discreta região na superfície do antígeno que se liga a região variável de um anticorpo. A região de ligação do anticorpo é composta por 3 *loops* hipervariáveis que podem variar na seqüência e no tamanho de tal forma que anticorpos gerados por uma célula apresentam uma única interface (Blythe e Flower, 2005). Apesar da extrema variabilidade desta região, o sitio de ligação do anticorpo é mais hidrofóbico que a maioria da superfície das proteínas com uma predileção por resíduos de tirosina (Blythe e Flower, 2005).

Os principais métodos de identificação de epitopos são: métodos imunoquímicos, como o método de SPOT, estudos de cristalografia de raio x e métodos de predição computacional.

Para realizar os ensaio de mapeamento de epitopos de LiD1, nosso grupo optou pelo método de *spot* que se baseia na síntese paralela de peptídeos em membranas de celulose (Frank, 1992) e também por métodos preditivos de bioinformática.

A técnica de *Spot* síntese é uma metodologia moderna que tem sido muito utilizada no estudo do mapeamento de epitopos (Laune, Molina *et al.*, 2002); (Chavez-Olortegui, Molina *et al.*, 2002); (Alvarenga, Diniz *et al.*, 2002; Machado De Avila, Alvarenga *et al.*, 2004); (Mendes, Maria *et al.*, 2004). Esta técnica baseia-se na verificação da reatividade de anticorpos mono ou policlonais frente a peptídeos sobrepostos sintetizados sobre uma membrana de celulose (Frank, 1992) de forma a percorrer parte ou a proteína completa em questão, variando-se de dois em dois ou de três em três aminoácidos C-terminais.

Os peptídeos localizados pela técnica de *Spot* síntese podem ser sintetizados e empregados como ferramenta em imunizações (Fischer e Howden, 1994), imunodiagnósticos (Sompuram, Kodela *et al.*, 2002) estudo de interações proteína-receptor (Fuchs, Kasher *et al.*, 2003) ou antígeno-anticorpo (Villard, Lacroix-Desmazes *et al.*, 2003). O peptídeo solúvel é obtido através da síntese sobre resina solúvel cujos aminoácidos utilizados estão disponíveis no mercado, com o grupamento amino protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila). Resumidamente, a técnica compreende liberação do grupamento N-terminal do Fmoc utilizando-se piperidina enquanto o aminoácido seguinte tem função carboxila ativada pela ação de DIPC (diisopropilcarbodiimida) e HOBT (hidroxibenzotriazol) para que ocorra a formação da ligação peptídica (Albericio e Carpino, 1997).

O uso de peptídeos sintéticos é muito amplo, sobretudo, quando o assunto são toxinas. A resposta imunológica de camundongos a peptídeos sintéticos correspondentes a epitopos específicos neutralizantes (Calderon-Aranda, Selisko *et al.*, 1999) é alvo de estudo para a produção de antivenenos mais específicos e de vacinas mais eficientes (Calderon-Aranda, Olamendi-Portugal *et al.*, 1995).

O mapeamento de epitopos pela técnica de *Spot* síntese é possível desde que o epitopo investigado seja linear. Entretanto, demonstrou-se por cristalografia de complexos antígeno-anticorpo que a maioria dos anticorpos monoclonais reconhece epitopos descontínuos (Davies, Basham *et al.*, 1990).

Nos últimos 25 anos, diferentes algoritmos foram desenvolvidos com o objetivo de prever epitopos de proteínas. Hoje em dia, mais de 31 métodos de bioinformática são disponíveis para tais análises. A maioria destes métodos baseia-se em parâmetros como acessibilidade, hidrofobicidade ou hidrofiliidade, antigenicidade, flexibilidade e estrutura secundárias.

Entretanto, somente em 2005, surgiram os primeiros métodos preditivos para epitopos conformacionais que levam em conta a estrutura tridimensional das proteínas: CEP ("Conformational Epitope Prediction") (Kulkarni-Kale, Bhosle *et al.*, 2005) e EMT ("Epitope Mapping Tool") (Batori, Friis *et al.*, 2006).

Mais recentemente, um método de bioinformática denominado PEPOP (Moreau, Fleury *et al.*, 2008) baseado tanto na seqüência do antígeno, quanto na sua estrutura tridimensional foi desenvolvido, o que possibilitou a localização de epitopos descontínuos na

superfície de proteínas. Este programa utiliza diferentes algoritmos com o objetivo de localizar regiões acessíveis na superfície das proteínas que poderiam corresponder a epítopos tanto lineares como conformacionais. O objetivo de PEPOP é propor, através da estrutura 3D de uma proteína, seqüências de peptídeos representativos de proteínas que possam servir como imunógenos ou serem reconhecidos por anticorpos já existentes.

1.12 PROTEÔMICA

A proteômica é definida como uma análise sistemática de proteínas buscando sua identidade, quantidade e função (Peng e Gygi, 2001)– a esse respeito.

No caso das aranhas do gênero *Loxosceles*, assim como na maioria dos animais peçonhentos (Liang, Chen *et al.*, 2000); (Li, Xiao *et al.*, 2004) têm desempenhado um papel muito importante. O estudo das diferenças entre os perfis protéicos que compõem os venenos pode trazer importantes informações sobre os aspectos estruturais bem como funcionais das proteínas.

Desde 2002, quando foi depositado no banco de dados do NCBI a seqüência da primeira proteína dermonecrótica de *L. intermedia* (Kalapothakis, Araujo *et al.*, 2002) e *L. laeta* (Fernandes Pedrosa Mde, Junqueira De Azevedo Ide *et al.*, 2002) até hoje, onde temos a seqüência de 92 proteínas de diferentes espécies de *Loxosceles*, muito se avançou no entendimento do mecanismo de ação deste veneno pelo melhor entendimento da ação de suas toxinas.

Hoje, sabemos, através de técnicas de proteômica, como eletroforese bidimensional que os venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* são constituídos de não somente uma, mas de diferentes proteínas na faixa de 30 a 35 kDa (Machado, Laugesen *et al.*, 2005; Kalapothakis, Chatzaki *et al.*, 2007) (Figura 6).

Kalapothakis e colaboradores (2007) considerando diferenças apenas na toxina madura, agrupou 14 diferentes toxinas, dividindo-as em 6 grupos como mostra a tabela 1.

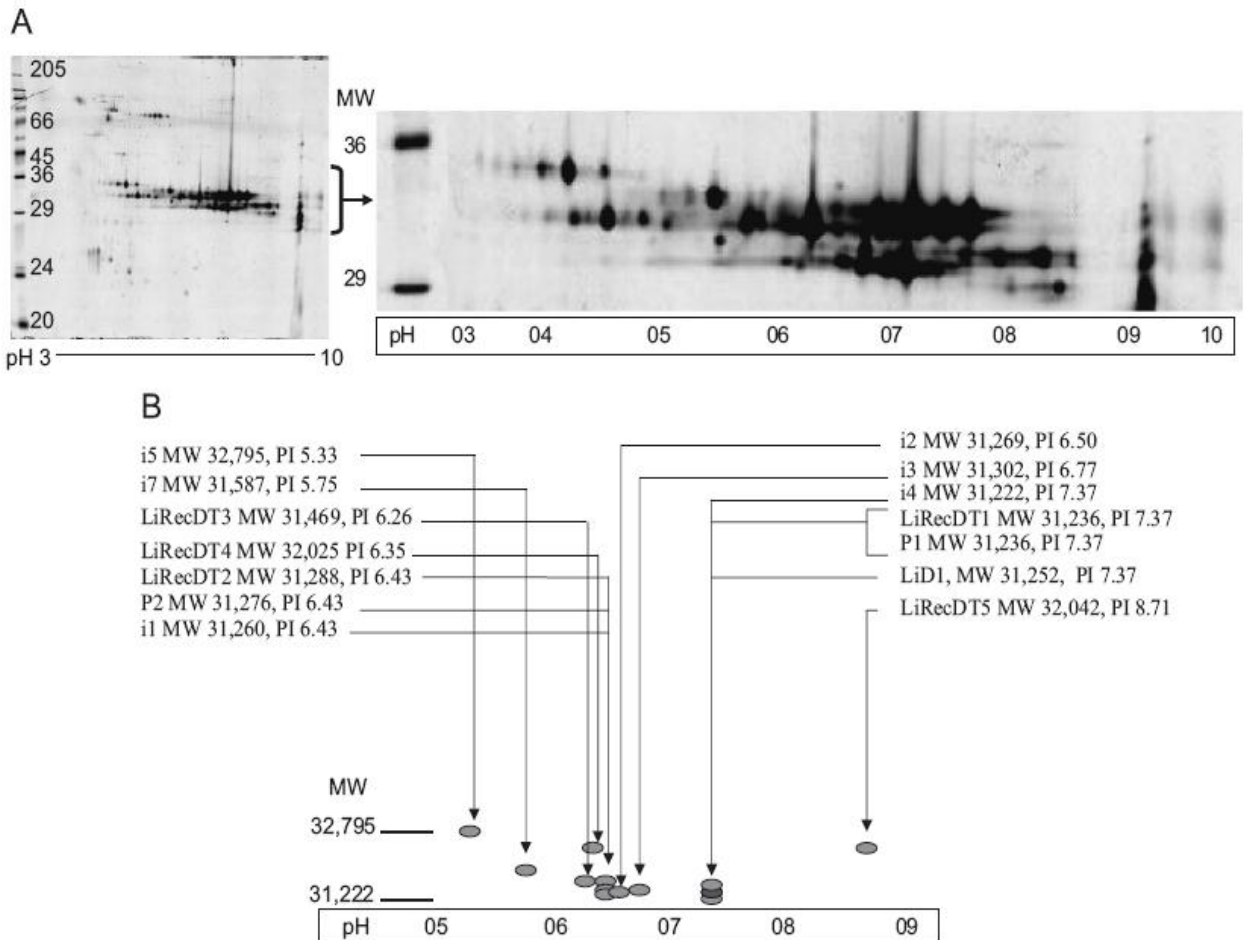


Figura 6- Perfil protéico do veneno de *Loxosceles intermedia*

(A) Padrão de eletroforese 2D obtida com o veneno de *L. intermedia*, indicando a presença de varias proteínas na faixa de peso molecular de 30-35 kDa. (B) Massa molecular teórica e ponto isoelétrico (PI) das 14 diferentes proteínas de *L. intermedia* (Kalapothakis *et al.*, 2007).

Este trabalho tem o propósito de produzir uma proteína recombinante com atividade dermonecrótica e avaliar suas propriedades antigênicas e imunogênicas. Anticorpos produzidas contra a proteína dermonecrótica serão testados contra as diferentes proteínas da família das dermonecroticas do veneno de *Loxosceles intermedia*. Peptídeos sintéticos baseados na sequência da proteína dermonecrotica serão sintetizados e testados como possíveis imunógenos protetores dos efeitos dermonecroticos do veneno.

Tabela 1 – Proteínas de 30 a 35 kDa do veneno de *L. intermedia*

Loxtox	Característica, ação e identidade entre as Loxtox do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>	
<i>Grupo 1</i>	Características	Identidade (%)
Loxtox i1	ND	99% identidade com LiRecDT2
Loxtox i2	ND	98% identidade com LiRecDT2
LiRecDT2 (Da Silveira, Pigozzo <i>et al.</i> , 2006)	Derm.↑, Esf. ↑, Hem.↑, Agreg.↑, P.V.↑, Inflam. ↑	99% identidade com P2
Loxtox i3	ND	99% identidade com LiRecDT2
P2 (Tambourqi, De <i>et al.</i> , 2004)	Derm.↑, Esf.↑, Hem.↑	99% identidade com LiRecDT2
<i>Grupo 2</i>		
LiD1 (Kalapothakis <i>et al.</i> , 2002 ; Araujo <i>et al.</i> , 2003 ; Felicori <i>et al.</i> , 2006)	Derm. ↑, Esf. ↓, Hem.↓, Agreg.↑, letal em coelhos	99% identidade com LiRecDT1
LiRecDT1 (Da Silveira <i>et al.</i> , 2006 (Chaim, Sade <i>et al.</i> , 2006)	Derm. ↑, Esf. ↑, Hem. ↑, Agreg. ↑, P.V. ↑, Inflam. ↑, letal em camundongos, indução de injurias renais	99% identidade com P1
Loxtox i4	ND	99% identidade com P1
P1 (Tambourqi <i>et al.</i> , 2004 ; (Tambourqi, Paixao- Cavalcante <i>et al.</i> , 2005)	Derm. ↑, Esf. ↓, Hem. ↑, Agreg. ↑, Clivagem de glicoforinas, indução de MMP-2 e MMP-9, Influxo de neutrófilos e dissociação de fibras de colágeno	99% identidade com LiD1
<i>Grupo 3</i>		
LiRecDT4 (Da Silveira, Pigozzo <i>et al.</i> , 2007)	Derm. ↓, Inflam.↑, Agreg. ↓ , Fosf.↑, não letal em camundongos	68% identidade com P2
<i>Grupo 4</i>		
Loxtox i5	ND	63% identidade com P2
<i>Grupo 5</i>		
LiRecDT5 (da Silveira <i>et al.</i> , 2007)	Derm. ↓, Inflam.↓ , Agreg. ↓, Fosf. ↓, não letal em camundongos	55% identidade com LiRecDT3
<i>Grupo 6</i>		
LiRecDT3 (da Silveira <i>et al.</i> , 2006)	Não Derm., Esf. ↓, Eritema, Inflamação difusa, P.V. ↓	55% identidade com LiRecDT5
Loxtox i6	ND	100% identidade com LiRecDT3 Exceto na região do peptídeo sinal
Loxtox i7	ND	98% identidade com LiRecDT3

Derm.= Atividade Dermonecrótica, Esf.= Atividade Esfingomielinasica, Hem.= Atividade Hemolítica, Inflam.= Inflamação, P.V.= Permeabilidade Vascular, Agreg.= Agregação Plaquetária, Fosf.= Atividade Fosfolipásica. ↑ = alta atividade, ↓ = baixa atividade, ⇕ = atividade média. ND = nenhum dado sobre atividade biológica (Kalapothakis *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Produção de uma proteína recombinante com atividade biológica a partir da glândula da aranha marrom *Loxosceles intermedia*, sua caracterização funcional e imunogênica (identificação, síntese e imunização com peptídeos), bem como a produção de antivenenos utilizando epitopos sintéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✘ Obter uma proteína recombinante da família das dermonecróticas, a partir da glândula produtora do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*;
- ✘ Avaliar a atividade biológica desta proteína através de ensaios para determinação de atividade dermonecrótica, hemolítica, esfingomielinásica e agregadora de plaquetas;
- ✘ Identificar os epitopos contínuos dessa proteína dermonecrótica (RLiD1) utilizando-se anticorpos policlonais anti-RLiD1 de camundongo e anti-*Loxosceles* de coelho e de cavalo através da técnica de síntese múltipla de peptídeos (*Spot-synthesis*);
- ✘ Sintetizar quimicamente os epitopos selecionados;
- ✘ Caracterizar os epitopos antigenicamente e imunogenicamente;
- ✘ Realizar ensaios de proteção *in vivo* e *in vitro* em animais imunizados com epitopos sintéticos e com RLiD1;
- ✘ Avaliar a presença de epitopos comuns em diferentes proteínas da família das dermonecróticas do veneno de *Loxosceles intermedia*;
- ✘ Realizar a predição de epitopos conformacionais por métodos de Bioinformática (MIMOP e PEPOP).

MATERIAL E METODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E VENENOS

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* foi fornecido pelo Laboratório de Pesquisa com Animais Peçonhentos (LIPAPE) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Brasil. O veneno foi obtido por eletrochoque de 15 volts no cefalotórax das aranhas. Em seguida, o veneno foi liofilizado e armazenado em criotubos de polipropileno de 1,5 mL, em temperatura de -80°C até utilização e diluído em PBS.

Os venenos de *L. gaucho* e *L. laeta* foram gentilmente cedidos pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Piraquara - PR), diluídos em PBS e congelados em alíquotas de 1 mg/ml. A peçonha da espécie *L. laeta* de origem peruana, e venenos de outros artrópodes como os da aranha *P. nigriventer* e do escorpião *T. serrulatus* foram obtidos a partir da coleção de venenos do laboratório do Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtégui.

Os camundongos utilizados foram fêmeas da linhagem Balb/c. No início do esquema de imunização, os animais tinham 5 semanas e em torno de 20g. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo, ICB-UFMG e receberam água e ração sob condições ambientais controladas.

Foram utilizados coelhos machos, da raça New Zealand, na média de 2 kg, comprados na Fazenda da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, recebendo água e ração sob condições ambientais controladas.

3.2 ANTIVENENOS

Soros hiperimune antiveneno Loxoscélico foram obtidos pelo Serviço de Produção de Plasmas e Soros da Divisão de Imunobiológicos do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos –CPPI Piraquara, PR, Brasil.

Anticorpos monoclonais anti-*L.intermedia* (Limab7) foram produzidos anteriormente em nosso laboratório, como descrito por (Alvarenga, Martins *et al.*, 2003). O Limab7 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-*L. intermedia*, como descrito por (Chavez-Olortegui, Fonseca *et al.*, 1994).

3.3 ENZIMAS E REAGENTES

A maioria dos reagentes de biologia molecular utilizados neste trabalho foram adquiridos de fornecedores como Sigma, GE Healthcare, Invitrogen, Novagen, BioRad e Promega. Estes apresentam grau de pureza adequado para Biologia Molecular.

3.4 CLONAGEM DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RLID1

O molde utilizado para amplificação da toxina recombinante foi a fita dupla de DNA inserida no vetor pBK-CMV obtida da biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *Loxosceles intermedia* (Kalapothakis, Araujo *et al.*, 2002). A clonagem foi realizada como descrito por (Araujo, 2005).

O cDNA de LiD1 (proteína dermonecrotica 1 de *Loxosceles intermedia*) (Figura 7)(Kalapothakis *et al.*, 2002) foi clonado no vetor pET11a (figura 8) digerido com BamH1.

A quantidade de plasmídeo obtida foi medida por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 260 nm e a qualidade da preparação (presença de contaminantes) usando o comprimento de onda de 280nm (GeneQuant- GE Healthcare).

As amostras de DNA obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA pH 8,0). O DNA foi corado com o brometo de etídio contido na preparação do gel (0,5 µg/mL) sendo visualizado sob luz ultravioleta.

As demais técnicas gerais de biologia molecular utilizadas neste trabalho (purificação de plasmídeo, precipitação com etanol, etc.) foram realizadas de acordo com Sambrook (1989).

3.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE RLID1

Bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* BL21 foram utilizadas para a expressão de LiD1. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubada sob agitação a 180 rpm (New Brunswick Scientific C25 Incubator) a 37°C por 12 h. Transferiu-se 1 mL da pré-cultura para uma nova cultura de 100 mL de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina que foi incubada a 37°C sob forte agitação (180 rpm) até a obtenção de densidade óptica (OD) entre 0,3 - 0,6 a 600 nm (Shimadzu UV – 150 – 02) por aproximadamente 3 h.

Em seguida foi adicionado IPTG na concentração final de 1,0 mM e retirado 1,5 mL da cultura, amostra essa correspondente ao tempo zero de indução. A partir desse momento foi coletado aproximadamente o mesmo número de células que no tempo 0, nos tempos 2, 4, 6 e 20 horas. Estabelecido o melhor tempo de 4 horas, o mesmo procedimento foi realizado em 1 L de meio de cultura. Após as 4 horas de indução, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o 'pellet' tratado com lisozima (1mg/ml) em PBS e sonificado com pulsos de 15 segundos durante 2 minutos e após, submetidos a centrifugação. O sobrenadante foi congelado a -80°C até o momento da purificação. Esta amostra foi então submetida a purificação em fase reversa em HPLC (AKTA Explorer 100 MARKA) usando a coluna C8 (Vydac – 2 x 2,5 cm, com partículas de diâmetro de 12 µm). As frações foram eluídas com gradiente linear de acetonitrila de 0-100% em TFA 0.1% em um fluxo de 5 ml/min. A absorbância das frações obtidas foram monitoradas a 280 nm. As frações contendo rLiD1 foram identificadas através de um ensaio de dot blot usando IgG F (ab')₂ anti-*L. intermedia* conjugado a peroxidase (Chavez-Olortegui, Zanetti *et al.*, 1998). O rendimento da purificação de rLiD1 foi determinado pelo método de (Bradford, 1976) usando BSA como padrão. A proteína recombinante foi liofilizada e sua pureza analisada por espectrometria de massa.

3.6 ENSAIOS DE MUTAGÊNESE SITIO DIRIGIDA

Para os ensaios de mutagênese sitio dirigida, aminoácidos preditos pelo programa de bioinformática MIMOP (item 3.28.4) (Y224, K229, R230 e Y248) e outros 2 aminoácidos controle K91 e N124) foram selecionados. Para isso, iniciadores foram desenhados baseados na seqüência nucleotídica de LiD1, como mostrado na figura 7. A seqüência desses iniciadores encontra-se na tabela 2.

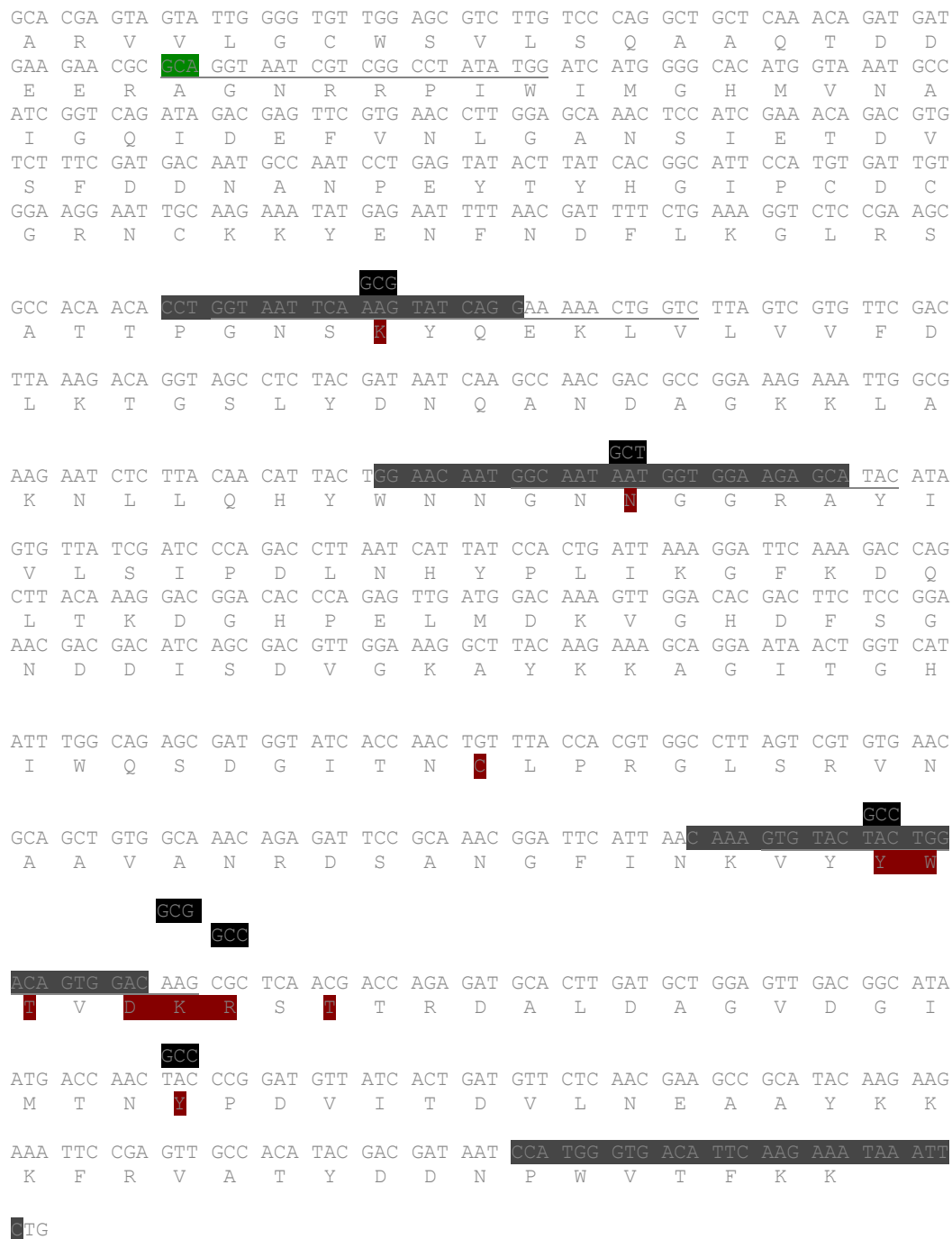


Figura 7 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos de LiD1.

A sequência da proteína madura esta destacada em cinza (Kalapothakis *et al.*, 2002). Em verde, estão destacados os nucleotídeos GCA, que marcam o início da proteína madura e sublinhado esta o iniciador desenhado para essa região. Os aminoácidos marcados em vermelho incluem tanto os aminoácidos preditos por MIMOP (Moreau, Granier *et al.*, 2006) quanto os aminoácidos controle escolhidos para serem mutados. Em preto, estão destacados os nucleotídeos que substituirão os nucleotídeos originais de LiD1, para que os respectivos aminoácidos sejam mutados por alanina. Cinza e sublinhado estão destacadas as regiões de iniciadores desenhadas.

Tabela 2 – Iniciadores desenhados para o estudo de mutagênese sitio dirigida

LiD1 F	CCAGGA TCC GCA GGT AAT CGT CGG CCT ATA TGG
K81A F	GGT AAT TCA GCG TAT CAG GAA AAA CTG GTC
N124A F	GGC AAT GCT GGT GGA AGA GCA TAC
Y224A F	GTG TAC GCC TGG ACA GTG GAC AAG
K229A F	ACA GTG GAC GCG CGC TCA ACG ACC
R230A F	GTG GAC AAG GCC TCA ACG ACC AGA G
Y248A F	G ACC AAC GCC CCG GAT GTT ATC
LiD1R	CCAGGA TCC G AAT TTA TTT CTT GAA TGT CAC CCA TGG
K81A R	GTTTTTC CTG ATA CGC TGA ATT ACC AGG
N124A R	TGC TCT TCC ACC AGC ATT GCC ATT GTT CC
Y224AR	GTC CAC TGT CCA GGC GTA CAC TTT G
K229AR	CGT TGA GCG CGC GTC CAC TGT CCA G
R230AR	GGT CGT TGA GGC CTT GTC CAC TG
Y248AR	C CGG GGC GTT GGT CAT TAT GCC

LiD1 representa os iniciadores do início e fim da seqüência de LiD1, apresentando os sítios de restrição para BamH1. F significa *forwad* e R significa *reverse*. Da mesma maneira, K81A F representa o iniciador desenhado em relação ao aminoácido K, na posição 81 para mutá-lo ao aminoácido A, sendo este o iniciador *forwad* (F).

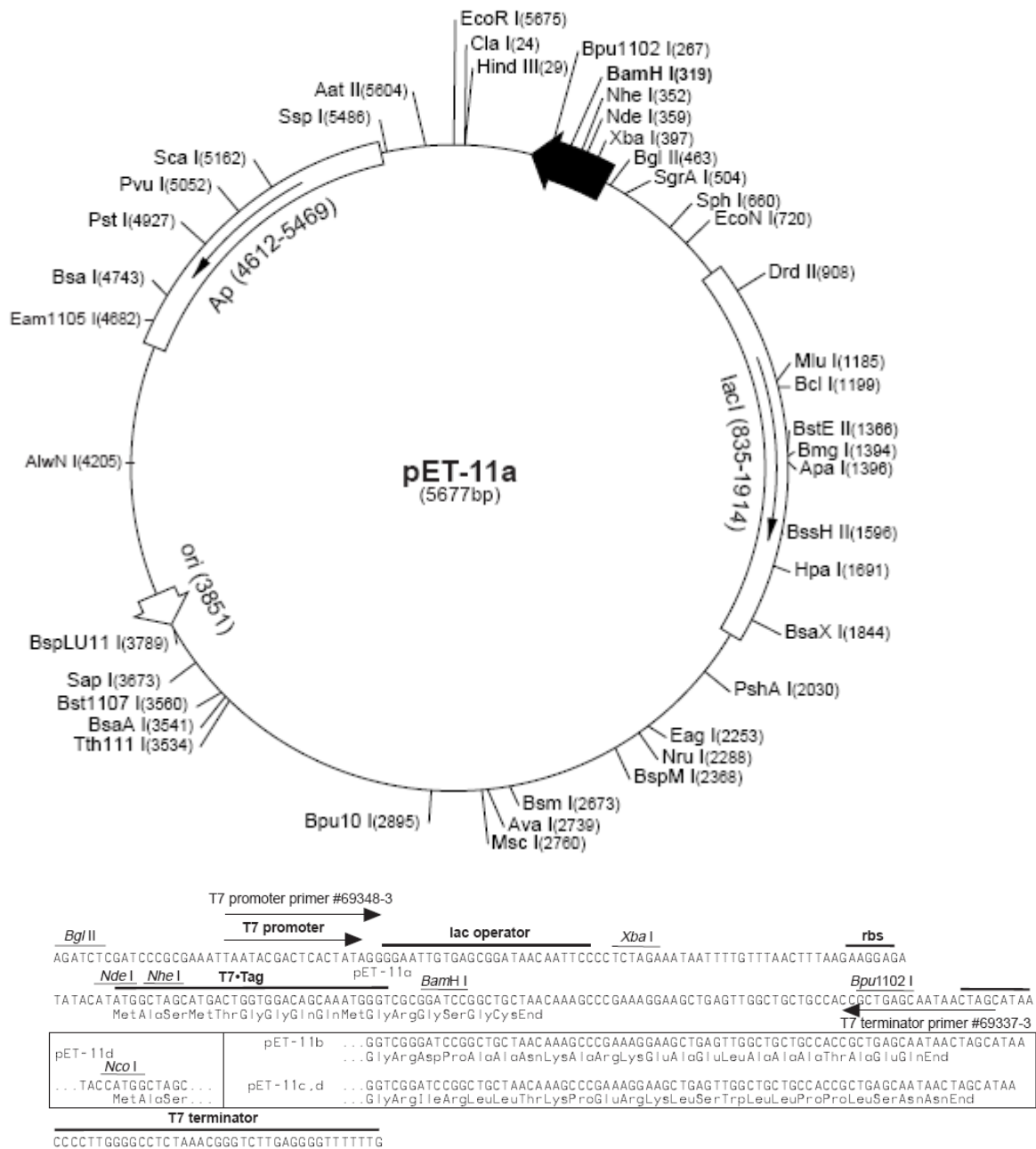


Figura 8 – Mapa circular e sitio múltiplo de clonagem do vetor de expressão pET11a (Novagen).

3.7 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS MUTADOS

Os ensaios de mutagênese sito dirigida foram realizados através de PCR (polymerase chain reaction) como descrito por Jones e Winistorfer (1997), utilizando os iniciadores da tabela 2.

As reações foram conduzidas no termociclador PTC-100TM (MJ Research Inc.) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 4 min; 15 ciclos de 94°C por 45 segundos, anelamento a 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C durante 1 min. Ao final dos 15 ciclos, a reação foi mantida por 7 min a 72°C. Os produtos foram analisados em eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente.

Para a amplificação dos fragmentos *forward* e *reverse*, os iniciadores LiD1 F e LiD1 R (tabela 2) foram utilizados e a PCR foi realizada como descrito acima, alterando o numero de ciclos de 15 para 28.

3.8 DOT BLOT

Uma análise de todos os picos obtidos da cromatografia de fase reversa foi realizada após estes serem liofilizados e ressuspendidos em 50 µl de água. Dez microlitros de cada pico foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose e incubados por 1 hora à 37 °C. Posteriormente, a membrana foi bloqueada por 1 hora em PBS contendo 0,3% de Tween 20. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com IgGs policlonais de cavalo anti-*L. intermedia*, conjugado à peroxidase, na diluição de 1:1000, em PBS-T. Após, 3 lavagens com PBS-T e duas lavagens com PBS foram realizadas e a reação foi revelada pela adição do substrato da peroxidase (1 mg/ml de diaminobenzidina, 0,5 mg/ml de 4-cloronaftol em 8% de metanol e 0,042% de H₂O₂ 30%).

3.9 ESPECTROMETRIA DE MASSA

As análises por espectrometria de massa deste trabalho, realizada com o auxílio do Dr. Adriano Pimenta da UFMG, foram do tipo ESI-Q-TOF usando um Q-TOF MicroTM (Micromass, Manchester, Grã Bretanha), equipamento usado com fonte de ionização de electrospray, operada em modo positivo. No capilar, a voltagem foi de 3,0-3,5 kV e as

voltagens dos 'sample cones' foi de 40-60 V. A calibração do espectrômetro foi realizada utilizando NaI, janela 100- 2000 m/z. As amostras foram aplicadas com uma micro seringa de fluxo de 5-10 µl/min (*electrospray*). Os dados foram analisados no programa Mass lynx[®] 4.0.

3.10 DOSAGEM DE PROTEÍNA

No presente trabalho, o método de Bradford (1976) foi o escolhido para a dosagem e o estabelecimento da concentração de todos os materiais necessários aos experimentos.

A cada poço de uma placa de microtitulação foi adicionado 180 µL de Reagente de Bradford – 0,1% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250* em solução aquosa com 5% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido fosfórico 85% - e 20 µL da amostra de proteína a ser dosada. Foi estabelecida uma curva padrão, utilizando-se um padrão já determinado de 1mg/mL de albumina de soro bovino, variando de 0,5 a 20 µg.

A preparação foi incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Os valores das absorbâncias foram determinados a 600 nm em um leitor de ELISA (Bio-Rad). A concentração protéica da amostra foi quantificada fazendo-se a equação da curva padrão, utilizando-se o programa Microsoft Excel.

3.11 ELETROFORESE E WESTERN BLOT

Amostras foram diluídas em tampão de amostra não redutor e uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) à 12,5 % foi realizada (Laemmli, 1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm. O *Western blot* foi realizado como descrito por Alvarenga e colaboradores (2003), utilizando o anticorpo primário Limab7 (10 µg/ml) e o anticorpo secundário (anti-mouse HRP) na diluição de 1:2000.

3.11.1 Gel SDS-PAGE

Dois géis em concentração de 12,5% de acrilamida (Laemmli, 1970) foram preparados para a migração do veneno de *L. intermedia* e de rLiD1 em presença de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) em sistema BioRad. Para ambos os géis utilizaram-se 20 µg, por canaleta, do veneno de *L. intermedia*, do extrato induzido com IPTG e de rLiD1 purificada. Estas amostras

foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutoras (Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)). A migração aconteceu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/l e SDS 0,5% , pH 8.3) sob voltagem de 150 V.

3.11.2 Método de coloração pela Prata

Para a coloração do gel, o método de coloração pela prata foi o adotado, segundo algumas modificações (Rabilloud, Vuillard *et al.*, 1994). Após a migração do gel, este foi embebido durante 1 hora a temperatura ambiente em solução fixadora – Metanol: Acido Acético: Formaldeído (5:1.2: 0.004) em água. Após 3 lavagens de 7 minutos com água, foi adicionado ao gel uma solução de tiosulfato de sódio a 4% durante 1 minuto. Novamente, o gel foi submetido a 3 lavagens de 7 minutos com água para posterior incubação deste, por 20 minutos, com a solução de prata – (0,1 g AgNO₃, 75 µl de formaldeído em 100 ml de água). A solução foi então incubada com a solução de desenvolvimento (6g de Na₂CO₃ , 50 µl Formaldeido, solução 2ml de Tiosulfato de sódio 4% em 100 ml água). Após o aparecimento das bandas, o gel foi colocado em contato com a solução de parada - Metanol: Acido Acético (5:1.2) em água.

3.11.3 Eletrotransferência

As proteínas de um dos géis foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA) em sistema BioRad Mini-Protean II cell, mediante corrente de 24 V durante 16 horas e, posteriormente, por mais uma hora a 48 V em tampão de transferência com pH 8,3 contendo glicina 0,2 mol/l, Tris 0,025 mol/l e metanol 20% (v/v).

3.11.4 Western blot

Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foi certificada mergulhando-se a membrana de nitrocelulose em solução de Ponceau 0,2% em 10% de ácido acético. Após visualização das bandas, a membrana foi lavada em tampão PBS-Tween (PBS-T) 0,05% por três vezes de 5 minutos e, posteriormente, bloqueada com tampão PBS-T 0,3%, por 1 hora, sob agitação e à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes e, para o *western blot*, incubada com o monoclonal 7 anti *L. intermedia* (LimAb7)

purificado em coluna de proteína A (Amersham Biotech) na concentração de 5 µg/ml em PBS-T 0,05%. As membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Após três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e, sob agitação, com anticorpos de cabra específicos para IgG de camundongos (A 4416 – Sigma) em diluição 1:2000. Após quatro lavagens, sendo as duas primeiras com PBS-T 0,05% e as duas últimas com PBS, a presença da peroxidase foi revelada com uma solução de PBS contendo 0,025% de 4-cloro 1-naftol diluído em 1 ml de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H₂O₂ 0,04%(v/v).

3.12 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO

rLiD1 foi reduzida e alquilada de acordo com Barbouche e colaboradores (2003). Sucintamente, a amostra foi tratada com β-mercaptoetanol e iodoacetamida na razão de 1:2,5 por 30 minutos à 25 °C. A amostra foi liofilizada para evaporação do β-mercaptoetanol.

3.13 ATIVIDADE DERMONECRÓTICA

A atividade dermonecrótica do veneno de *L. intermedia* e da proteína recombinante foram determinadas em coelhos como descrito por Furlaneto (1962), porém no dorso do animal. Sucintamente, diferentes concentrações das amostras foram diluídas em 0,1 ml de solução salina fisiológica e injetados i.d. no dorso de coelhos pesando aproximadamente 2 kg. Os animais foram observados por 72 horas. A atividade dermonecrótica é definida como a menor concentração do veneno que induz uma área necrótica de 1 cm² e expresso como a mínima dose necrosante (MND). Para a medida mais precisa desta área contamos com o auxílio de um padrão de medidas de áreas, como mostra a figura 9.

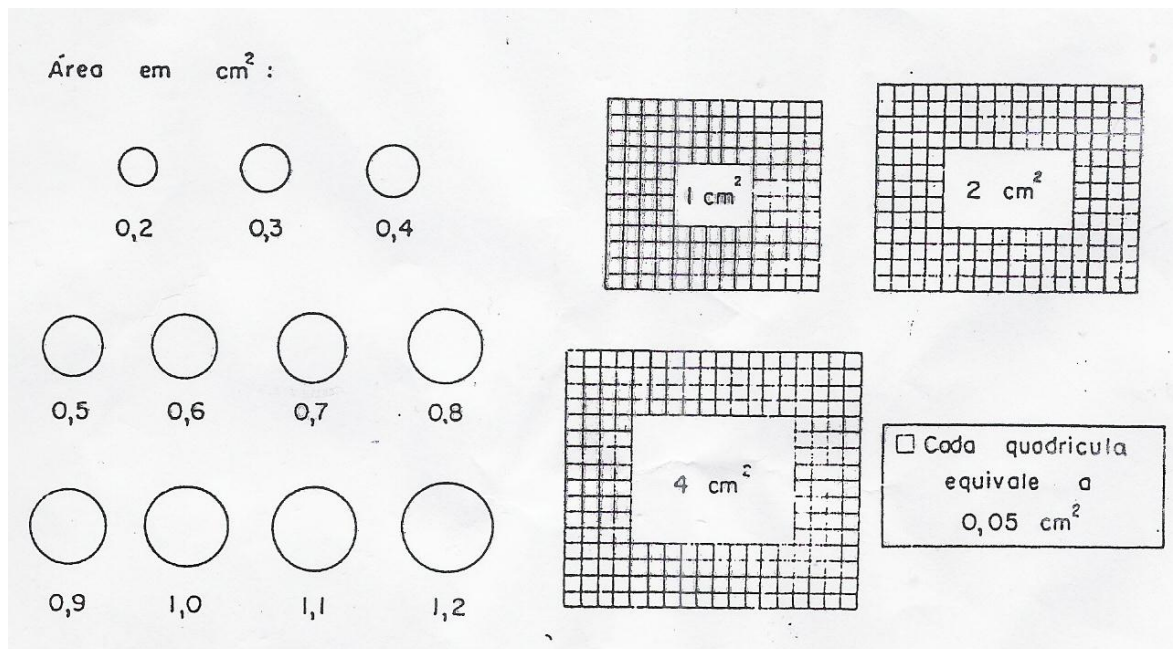


Figura 9- Padrão para medidas de áreas.

Obtido do Instituto Nacional de Endemias Rurais – Centro de Pesquisas de Belo Horizonte.

3.14 ENSAIO HEMOLÍTICO

Hemácias de doadores de grupo sanguíneo ORh⁺ foram coletadas em heparina, lavadas e diluídas em tampão TBS-gel (Trietanolamina 0,025 mol/l, MgSO₄ 5x10⁻⁴ mol/l, CaCl₂ 1,5x10⁻⁴ mol/l, gelatina 0,05%, pH 7.4) até obtenção da concentração de 5x10⁸ células/ml. Para tanto, 100 µl desta suspensão de eritrócitos foi diluída em 2,4 ml de água destilada e a absorbância lida a 541 nm. O resultado foi utilizado na equação abaixo com a finalidade de se determinar o volume para o qual a suspensão inicial deveria ser diluída para se obter a concentração desejada:

$$\text{Volume final} = \text{Vol. Inicial} \times A_{541 \text{ nm}}/0,210$$

Após a diluição as células foram mantidas em gelo até o uso, momento no qual 200 µl destas hemácias foram incubadas com veneno de *L. intermedia* ou rLiD1, nas quantidades de 0.25, 0.5, 1, 2 e 4 µg, em duplicata. Estas, foram incubadas por mais 1 hora à 37°C sob leve agitação. A seguir, a suspensão de eritrócitos foi lavada com o tampão TBS-gel por cinco vezes utilizando-se centrifugação de 1600 rpm por cinco minutos. Logo após, as hemácias foram ressuspensas em 400 µl de TBS-gel e incubadas por 1 h à 37°C com 100 µl de soro proveniente do mesmo doador dos eritrócitos. Após a incubação, as duplicatas foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à leitura de absorbância a 541 nm. O resultado é catalogado em porcentagem de lise sendo os valores de referência à hemólise total (com a água) -100% e hemácias com o tampão e SNh – 0%.

3.15 ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

Incubou-se 1.25, 2.5, 5, 10 e 20 µg de veneno total de *L. intermedia* ou rLiD1 diluídos em 100 µl do tampão PBS 0,05 mol/l pH 7.4. com 16 µM de TNPAL-*sphingomyelin* diluídos em 100 µl de tampão Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% Triton X-100 e 0,02 M MgCl₂ por 30 minutos, utilizando-se um *Thermomixer* em agitação de 1.000 rpm. A reação foi interrompida por adição de 750 µl de uma mistura de isopropanol/heptano/5% M H₂SO₄ (40:10:1). A próxima etapa consistiu da adição de 400 µl de heptano e 400 µl de água. A solução foi homogeneizada em vórtex e centrifugada por 10 min a 3000 g de forma a separar as duas fases. Posteriormente, a absorbância da fase orgânica foi obtida a 330 nm. Os resultados foram expressos em nmol de hidrólise de esfingomielina de acordo com Gatt e colaboradores (1978).

3.16 ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Estudos de agregação plaquetária foram realizados de acordo com Esteveao-Costa e colaboradores (2000) em plasma rico em plaquetas. Resumindo, sangue (18 ml) de voluntários normais (mínimo de 5 doadores) sem medicação por um intervalo mínimo de 14 dias foi coletado em 2 ml de citrato de sódio 0.1M. Este sangue foi centrifugado a 1600 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante, plasma rico em plaquetas (PRP) foi removido, e o sangue restante centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). ADP, 5 μ M, foi usado como agonista. Todas as medidas de agregação foram realizadas dentro de 3 horas após a coleta de sangue, usando o Packs-4 Platelet Aggregation Chromogenic Kinetic System (Helena Laboratories, Beaumont, TX).

3.17 PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO

Após a coleta do soro pré-imune, 10 camundongos receberam injeções subcutâneas (s.c.) de 0.2 mg de rLiD1 (dia 1). Reforços foram dados 6, 10 e 15 dias posteriores via s.c. com 20 μ g de rLiD1. Um grupo controle recebeu PBS nas mesmas condições. O soro imune foi coletado no dia 20.

Em relação à imunização de coelhos, machos, da raça New Zealand pesando de 2 a 3 quilos foram usados no esquema de imunização. Dois coelhos foram utilizados por grupo de imunização. Após a coleta de soro pré-imune, cada animal recebeu uma dose inicial de 50 μ g de rLiD1 ou 120 μ g da mistura dos peptídeos sintéticos (20 μ g de cada peptídeos) em adjuvante completo de Freund. Três reforços subcutâneos foram dados em adjuvante incompleto de Freund, segundo mostra a tabela 3. O sangue dos animais foram coletadas uma semana após a última injeção ou após 2 meses. Como controle das imunizações, coelhos foram imunizados com 10 μ g de veneno de *L. intermedia*, e outros com 120 μ g de um peptídeo não relacionado do escorpião *Tityus serrulatus* (seqüência) seguindo o mesmo esquema de imunizações. Outro grupo de coelhos foi imunizado com o peptídeo obtido do mapeamento de epitopos com o soro de camundongos, seguindo o mesmo esquema de imunização.

Tabela 3 – Esquema de imunização de coelhos

Grupos	Antígeno/ dose			
	Dia 0	Dia 15	Dia 22	Dia 29
1	LiD1/50 µg	LiD1/50 µg	LiD1/50 µg	LiD1/50 µg
2	LiD1/50 µg	LiD1/50 µg	LiD1/50 µg	Peptídeos /120 µg
3	LiD1/50 µg	LiD1/50 µg	Peptídeos /120 µg	Peptídeos /120 µg
4	LiD1/50 µg	Peptídeos /120 µg	Peptídeos /120 µg	Peptídeos /120 µg
5	Peptídeos/120 µg	Peptídeos /120 µg	Peptídeos /120 µg	Peptídeos /120 µg

3.18 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

O mesmo volume da solução de sulfato de amônio saturado (50%) foi adicionado lentamente ao pool de soros com auxílio de uma bureta. A precipitação foi feita a 4°C por 12 horas, sob leve agitação.

O conteúdo com o precipitado foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado por 30 minutos a 5000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as proteínas foram solubilizadas e dialisadas contra PBS pH 7,2 por 48 horas, trocando-se o PBS duas vezes ao dia para completa retirada do sulfato de amônio. As proteínas solúveis foram dosadas pelo método de Bradford e submetidas à purificação em Proteína A (Ey, Prowse *et al.*, 1978). Resumidamente, a coluna de Proteína A foi equilibrada com 40 volumes de PBS. O soro precipitado foi então adicionado (2 ml) e deixado em contato com a *Sepharose-Proteína A* por 16 horas à 4°C. Após, a coluna foi lavada com 50 volumes de PBS e a IgG purificada foi eluída com tampão glicina 0,1M, pH 2,8 com NaCl 0,15 M. O eluato foi neutralizado com tampão Tris/HCl 1 mol/l pH 8,0 e posteriormente dialisado contra PBS.

3.19 ELISA

3.19.1 ELISA indireto

Placas de ELISA de 96 poços (Becton Dickinson France S.A.) foram sensibilizadas e incubadas durante a noite à 4°C com 100 µl de diferentes antígenos no tampão bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9.6. As placas foram lavadas com solução de lavagem (0,05% Tween-salina) e bloqueadas com a solução de bloqueio (caseína a 2% diluída em PBS). Como fonte de primeiro anticorpo foram usados os soros de animais imunizados diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20). O segundo anticorpo adicionado, trata-se de imunoglobinas heterólogas anti-IgG de cavalo, camundongo ou coelho conjugados com a enzima peroxidase (Sigma, diluído 1:1000 em tampão de incubação). A atividade enzimática foi revelada utilizando-se a solução ortofenilenodiamino (OPD) como substrato (0,33 mg/ml em tampão citrato pH 5,2, na presença de 0,04% de água oxigenada). Após 15 minutos de incubação, a reação é interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras da absorbância foram feitas a 492 nm em um leitor de ELISA (Titertek Multiscan spectrophotometer). Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

Esse procedimento de ELISA foi utilizado varias vezes ao longo deste trabalho, seguindo basicamente esse protocolo. As diferenças consistem no antígeno sensibilizado na placa e nos soros utilizados.

3.19.2 ELISA de competição

Outro formato de ELISA foi também realizado. O soro de coelhos anti-peptídeos foi pré-incubado por 16 horas à 4°C com cada um dos peptídeos sintéticos, com o objetivo de se avaliar qual(is) do(s) peptídeo(s) seria o responsável pela não ligação desse soro à rLiD1. Para isso, placas de ELISA foram sensibilizadas com rLiD1, na concentração de 5 µg/ml, em tampão bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6. Após o bloqueio, a mistura do soro anti-peptídeos e cada um dos peptídeos foi adicionada às placas por 1 hora à 37°C. A ligação dos anticorpos foi revelada utilizando-se anti-IgG de coelho peroxidase. Valores de referência de absorbância foram obtidos com a incubação do soro anti-peptídeos sozinho.

3.20 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANA DE CELULOSE

A opção pela síntese paralela de peptídeos sobre membrana de celulose deu-se por permitir a síntese rápida e eficiente de um grande número de peptídeos (816 por síntese ou ciclo), em delimitações pontuais por volume de deposição de cada resíduo.

A seqüência primária dos aminoácidos obtidos das proteínas dermonecróticas de *Loxosceles intermedia* (Kalapothakis, Araujo *et al.*, 2002); (Kalapothakis, Chatzaki *et al.*, 2007), além de peptídeos preditos pelo programa de bioinformática PEPOP foram utilizadas para construção da membrana de Spot-síntese.

Os aminoácidos são depositados em volume mínimo (0,6 µl) com auxílio de um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto. A síntese múltipla foi realizada em sintetizador (Abimed Spot Synthesis-ASP222, Langenfeld, Alemanha, conforme a Figura 10, e o plano de distribuição dos aminoácidos bem como a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos foram definidos em programa de computação Multipeps (Molina, Laune *et al.*, 1996).

Os grupamentos hidroxilas livres sobre a membrana de celulose são utilizados como pontos de ancoragem para a síntese do peptídeo. Esses grupamentos são conjugados através de ligação estável com 8 a 10 unidades de polietileno-glicol (PEG), objetivando afastar o peptídeo do suporte e conferir maior estabilidade na ligação do peptídeo à membrana.

A síntese do peptídeo inicia-se pelo C-terminal do último aminoácido da seqüência determinada. Com a desproteção do grupo ligado ao Fmoc, pela adição de piperidina (20% em DMF), as funções amins são recuperadas e podem ser visualizadas pela coloração azul com bromofenol.

Os aminoácidos são, em seguida, ativados por DIC/HOBT (150 µl cada aminoácido) e depositados para reinício de outro ciclo, sendo que os ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74 a 87% por ciclo. A reposição de aminoácidos sempre começa com a arginina, por ela ser o aminoácido mais lábil, e cada aminoácido é depositado duas vezes por ciclo. As reações de ligação são monitoradas por mudança de coloração dos Spots, passando da cor azul ao verde-amarelado.

As funções NH₂ livres, ou que não reagiram, são acetiladas (anidrido acético 10% em DMF) para evitar a formação de peptídeos irregulares ou outras ligações indesejáveis. O

grupo protetor Fmoc do próximo aminoácido é novamente clivado, em meio básico pela piperidina, verificando a ligação pela coloração com bromofenol. Efetuam-se lavagens da membrana com metanol, e secagem da mesma ao ar fresco. Em seguida, a membrana é realocada no sintetizador para outro ciclo. O acompanhamento faz-se necessário durante todo o processo, sendo a verificação um passo essencial para se assegurar de que a síntese está efetuando-se corretamente. Cada etapa constitui um ciclo da síntese, realizado em média em 1 h e 15 min, e será repetido quantas vezes for necessário para obter-se os peptídeos totais alongados.

Pelo método de Spot, o tamanho do peptídeo construído é limitado a 15-20 aminoácido (Laune, Molina *et al.*, 2002), pois persistem dúvidas quanto à qualidade da ligação de peptídeos muito alongados ou grandes. Ao final da síntese, os grupos laterais, inicialmente protegidos dos aminoácidos, são desprotegidos pela adição de ácido trifluoracético-TFA associado a diclorometano e trietilsilano. Finalmente, os peptídeos encontram-se fixados de maneira covalente sobre a membrana.

A membrana construída contendo os diversos peptídeos pode ser analisada por imunoensaios de calorimetria indireta. A capacidade dos peptídeos sintéticos de se ligarem com anticorpos é avaliada por ensaios imunológicos e estes podem ser reproduzidos em torno de 30-40 vezes utilizando-se a mesma membrana para anticorpos policlonais, e até 70 vezes para anticorpos monoclonais.

Devido às suas qualidades, esta metodologia vem sendo amplamente empregada em estudos para identificação e mapeamento de determinantes antigênicos nas estruturas protéicas e predições de estruturas funcionais destas moléculas.

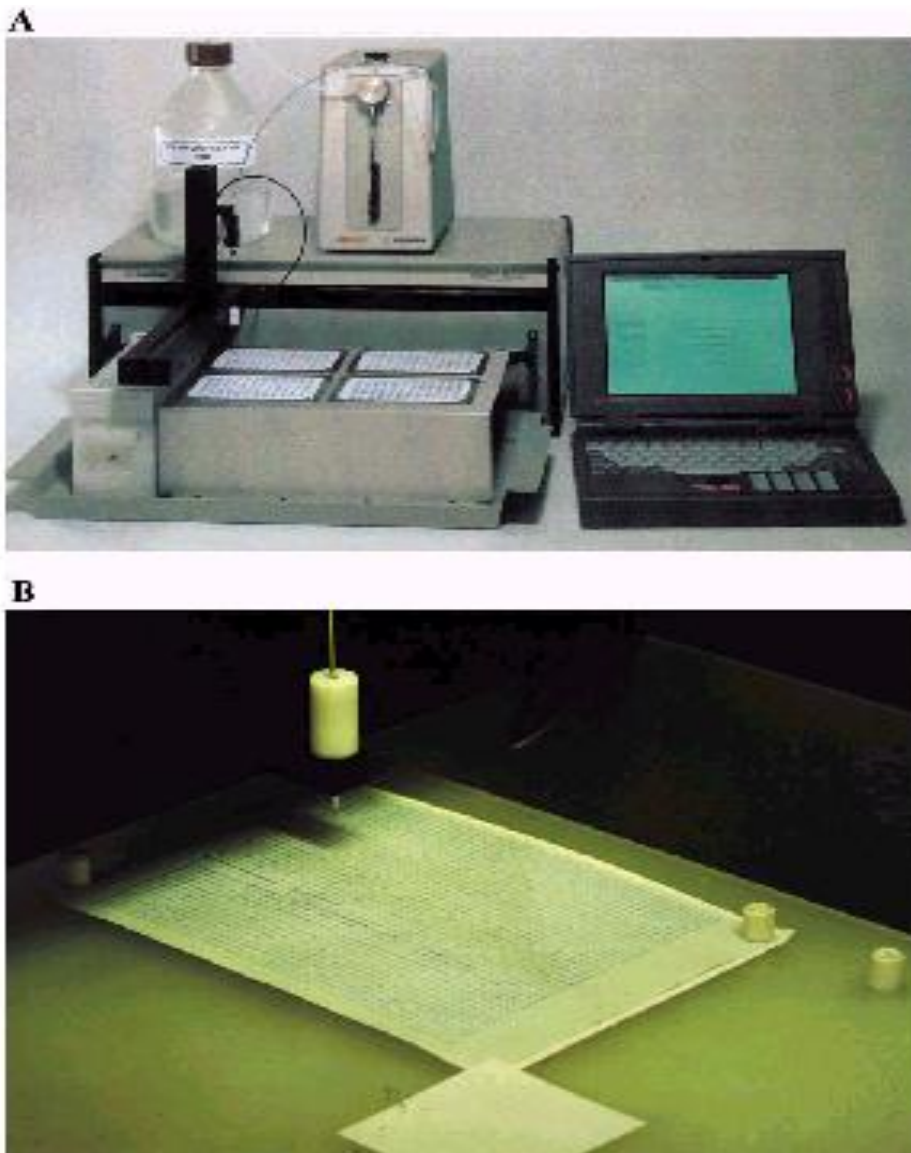


Figura 10 - MultiPep. (A) ASP 222, aparelho que constrói os peptídeos na membrana. (B) ASP 222 em funcionamento. Frank (2002).

3.21 IMUNOENSAIOS COM PEPTÍDEOS LIGADOS À MEMBRANA

As membranas contendo os peptídeos foram lavadas três vezes, com TBS (Salina, KCl 0,002M, Tris 0,05 M), pH 7,4, durante 10 minutos, e então saturadas com solução de bloqueio (Genosys, França) 2 ml e 1 g de sacarose em 18 ml de TBS- Tween 0,1% (TBS-T) durante a noite à temperatura ambiente. Após bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com os soros testes por 90 min à 37°C. Após novas lavagens os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina (Sigma), na diluição de 1:2000 foram adicionados e mantidos sob agitação por 1 hora. Após duas lavagens com T-TBS e mais duas com CBS pH 7 (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 2,1 g de ácido cítrico monohidratado em 1 L de água) por 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente foi adicionado o substrato (180 ml MTT, 120 ml BCIP, 120 ml MgCl₂, q.s.p. para 30 ml de CBS) por 30 minutos.

3.22 CICLIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS NA MEMBRANA DE SPOT

Os peptídeos sintetizados na membrana com cisteínas nas extremidades foram oxidados para a formação de pontes dissulfeto. Para tal, as membranas foram tratadas com dimetilsulfoxide (DMSO) à 20%, diluído em TBS, pH 7,5 durante toda a noite. A membrana é então lavada 5 vezes de 3 minutos com água e após, com etanol.

3.23 ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS SPOTS

As membranas foram então escaneadas e a intensidade de cada spot foi medida com o programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). As intensidades foram calculadas de acordo com a média da intensidade em uma determinada área delimitada, e então o valor do spot mais reativo foi tido com 100% e comparado com os demais.

3.24 REGENERAÇÃO DA MEMBRANA

Ao final dos ensaios imunológicos as membranas foram submetidas a um tratamento de regeneração, para sua posterior reutilização. Inicialmente com dimetilformamida, seguido por uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol, e finalmente com uma solução com 10% ácido acético em etanol, para remover os complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos (3 lavagens de 10 minutos cada). Este procedimento de regeneração

permite o uso das membranas 30-40 vezes utilizando-se a mesma membrana, para anticorpos policlonais e até 70 vezes para anticorpos monoclonais (Frank, 1992).

3.25 SÍNTESE SOLÚVEL DE PEPTÍDEOS

Os peptídeos selecionados foram sintetizados utilizando-se um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida, gel (SPPS), que usa aminoácidos especiais para síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila) e são acoplados à fase sólida que também se encontra protegida (resina). O protocolo foi executado conforme (Merrifield, 1969), introduzindo-se nele algumas modificações: 54 mg da resina (Rink Amide-40 μM) foram colocados em um tubo de síntese e o seu grupamento Fmoc foi liberado, cobrindo a resina com 3 ml de piperidina 20% em DMF (Dimetilformamida). A resina foi lavada três vezes por 10 minutos com a solução mencionada, em agitação contínua à temperatura de 37°C. Todas as lavagens foram feitas com auxílio de uma bomba a vácuo.

O tubo de síntese foi lavado 3 vezes com 5 ml de DMF por lavagem. Iniciou-se, então, o acoplamento dos aminoácidos Fmoc. A quantidade despendida para cada aminoácido foi equivalente a 160 μM . O primeiro aminoácido a ser acoplado é ligado pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amina da resina, formando uma ligação peptídica.

O primeiro aminoácido foi posto no tubo de síntese e para 160 μM de aminoácido foram colocados 21,6 mg de HOBt (hidroxibenzotriazol) e 25 μL de DIPC (diisopropilcabodiimida). O DIPC e HOBt são reagentes que permitem a ativação da função carboxila dos aminoácidos Fmoc.

Com DMF suficiente para cobrir toda a resina, o tubo ficou sob agitação por 180 minutos, a 37 °C. Após esse tempo, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de uma bomba a vácuo, e a resina lavada com DMF por 3 vezes.

O grupamento amina desse primeiro aminoácido acoplado foi desprotegido lavando-se a resina com 3ml de uma solução de piperidina 20% em DMF, três vezes de 10 minutos cada, com agitação contínua à 37 °C.

O segundo aminoácido, com seu grupamento amina protegido, foi colocado no tubo de síntese juntamente com o HOBt e DIPC e este foi processado exatamente como o

anterior. Este ciclo foi repetido até que todos os aminoácidos do peptídeo estivessem acoplados.

Após o término do derradeiro ciclo, o último aminoácido foi desprotegido como os anteriores e a resina lavada 4 vezes, durante 5 minutos cada, com diclorometano. O peptídeo foi desligado da resina pelo uso de uma solução de clivagem contendo 2,5% de β -mercaptoetanol + 2,5% de água, num volume final de 5mL de TFA (ácido trifluoracético). O tubo de reação ficou agitando com esta solução por 4 horas.

A solução com os peptídeos foi colhido com auxílio de uma bomba a vácuo e os produtos da síntese foram precipitados com éter gelado overnight a 4°C. O tubo foi lavado e centrifugado três vezes a 3000 rpm por 30 minutos, enquanto o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspensionado em solução de água e TFA 0,1%.

Os peptídeos obtidos foram, então, analisados em espectrômetro de massa, liofilizados, purificados em HPLC e, novamente, analisados em espectrômetro de massa para confirmar a exatidão da seqüência.

3.26 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

O peptídeo foi solubilizado em 80% de ácido acético e submetido à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- Shimadzu) acoplada à coluna VYDAC-C18. Por sua vez, a coluna foi lavada com solução A (TFA 0,1% em água) por 10 minutos. Os componentes presentes foram eluídos, utilizando-se um gradiente que variou entre 0 e 80% de acetonitrila em 90 minutos (0–15 minutos até 20% de acetonitrila em fase B e de 15-30 minutos até 40% de acetonitrila em fase B, sendo que de 30-60 minutos até 50% de acetonitrila em fase B e de 60-70 minutos até 80% de acetonitrila em fase B e os seguintes 20 minutos foram utilizados para lavagem da coluna). Após a purificação, os peptídeos foram submetidos à espectrometria de massa (Shimadzu micromass Q-Tof- microTM), e sua massa molecular foi confirmada.

3.27 ENSAIOS DE TOXICIDADE

O ensaio de toxicidade do veneno de *L. intermedia* é determinado por injeção do veneno em 0.5 ml de solução salina em camundongos. Neste trabalho, dez camundongos imunizados com rLiD1 foram desafiados com 25 µg do veneno de *L. intermedia*, o que corresponde a 2.5 DL₅₀. O número de camundongos mortos foram contados 48 horas após a injeção do veneno.

3.27.1 Atividade dermonecrótica

A neutralização da atividade dermonecrótica de rLiD1 foi determinada em coelhos imunizados e não imunizados. Para os ensaios de neutralização in vivo, os coelhos foram desafiados 120 dias após a última imunização pela injeção intradérmica de 10 µg de rLiD1/kg de animal.

Para os ensaios de neutralização in vitro, IgGs dos coelhos imunizados foram purificadas, como descrito no item 3.13. Os anticorpos purificados dos 5 grupos listados na tabela 2, foram pré-incubados por 1 hora à 37°C com rLiD1 em um volume final de 100 µl em PBS. Como controle, a proteína sozinha foi incubada à 37 °C e também foi incubada com IgG de cavalo anti-*L. intermedia* sabidamente neutralizante.

3.27.2 Medida de edema e da área hemorrágica

As medidas de espessura da pele para avaliação de edema e de área hemorrágica, na pele dos coelhos foram avaliadas, após 72 horas da injeção de rLiD1 nos animais imunizados e não imunizados. Para a medida da área hemorrágica utilizamos o mesmo padrão de medidas utilizados na medida da área dermonecrótica (Figura 9). O edema foi medido com o auxílio de um paquímetro. Três medidas perpendiculares da lesão foram registradas e feita sua média aritmética.

3.28 BIOINFORMÁTICA

3.28.1 Modelagem Molecular

O modelo tridimensional da proteína dermonecrótica foi obtido por homologia (homology modelling), usando o programa package Modeller (Martin-Renom *et al.*, 2000). A estrutura tridimensional de SMase I (código no PDB: 1XX1) de *L. laeta* (Murakami, Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2005) obtida por cristalografia de raios X foi usada como molde. A visualização do modelo de rLiD1 e a localização do peptídeos em sua estrutura foi visualizada usando o programa swiss-pdbviewer (Guex e Peitsch, 1997).

3.28.2 Alinhamento estrutural

O alinhamento estrutural de LiD1 foi feito utilizando o programa JOY (<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/cgi-bin/cgiwrap/kenji/joy.cgi?example=y>) (Mizuguchi, Deane *et al.*, 1998). A acessibilidade e estrutura secundária de LiD1 foi calculado usando o programa DSSP (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dssp.html>).

3.28.3 PEPOP

O programa PEPOP (<http://diagtools.sysdiag.cnrs.fr/PEPOP/>) (Moreau *et al.*, 2008) foi utilizado para a predição de epitopos descontínuos de rLiD1. Para isso, o calculo de acessibilidade da proteína foi realizado e esta foi dividida em 4 grupos. Para cada um desses grupos, parâmetros como tamanho, acessibilidade, hidrofobicidade, presença de volta- β e de aminoácidos especiais, como W, R, Y e P. Cada um desses parâmetros, foi avaliado individualmente ou combinados de todas as maneiras possíveis. O numero de aminoácidos escolhidos para a predição foi de 15. Os métodos de predição utilizados foram o de vizinhos próximos (nearest neighbor- NN) e a otimização do vizinhos próximos (optimized nearest neighbor – ONN).

3.28.4 MIMOP

MIMOP é um programa de bioinformática que auxilia na localização de um epitopo na estrutura tridimensional de uma proteína a partir de peptídeos (mimotopos) selecionados por phage-display. Resumidamente, MIMOP utiliza dois métodos diferentes. O primeiro método alinha mimotopos e a seqüência do antígeno por diferentes métodos de alinhamento múltiplo de seqüência: DIALIGN (Morgenstern, Frech *et al.*, 1998), T-COFFEE (Notredame, Higgins *et al.*, 2000), Multalin (Corpet, 1988) e DCA (Stoye, Moulton *et al.*, 1997) resultando em um alinhamento múltiplo. Os aminoácidos provenientes desse alinhamento e acessíveis ao solvente -acessibilidade calculada por DSSP (Kabsch e Sander, 1983) – e também freqüentes e similares às seqüências dos mimotopos são selecionados e agrupados (agrupamentos realizado pelo programa PHYLIP v3.6 (Felsenstein, 1989) de acordo com sua distância espacial. Esses agrupamentos são pontuados.

No segundo método, a seqüência dos mimotopos são primeiramente agrupadas de acordo com a similaridade de seqüência entre elas. Para cada agrupamento, regiões consenso são identificadas com o algoritmo PRATT (Jonassen, Collins *et al.*, 1995). Resíduos acessíveis na superfície da proteína correspondentes ao consenso são selecionados.

A região consenso na superfície da proteína é selecionada se todos os aminoácidos da região consenso estiverem na esfera de 10 Å.

Em um passo adicional, intersecções são calculadas pela comparação dos grupos selecionados pelo primeiro método com regiões selecionadas no segundo método. Estas regiões são também pontuadas e representam um possível epitopo. Para a predição de epitopo de rLiD1, reconhecida pelo Limab7, os 4 mimotopos selecionados por phage display, MIMOP foi utilizado.

3.28.5 Análise de resíduos estabilizadores

Para análise de resíduos estabilizadores de SMase I (<http://sride.enzim.hu/>) utilizamos parâmetros descritos por (Gromiha, Pujadas *et al.*, 2004), como hidrofobicidade, contatos de longa distância (LRO -long-range order), centro de estabilização e valores de conservação.

RESULTADOS

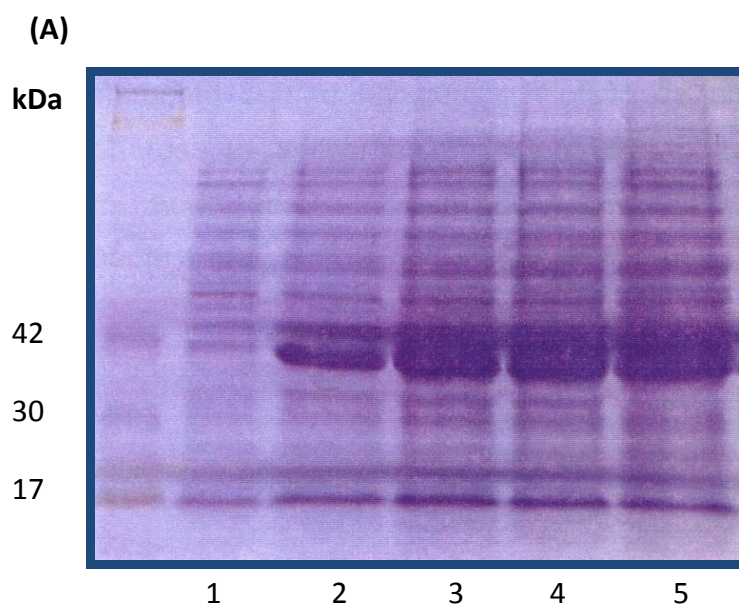
4 Resultados

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE rLiD1

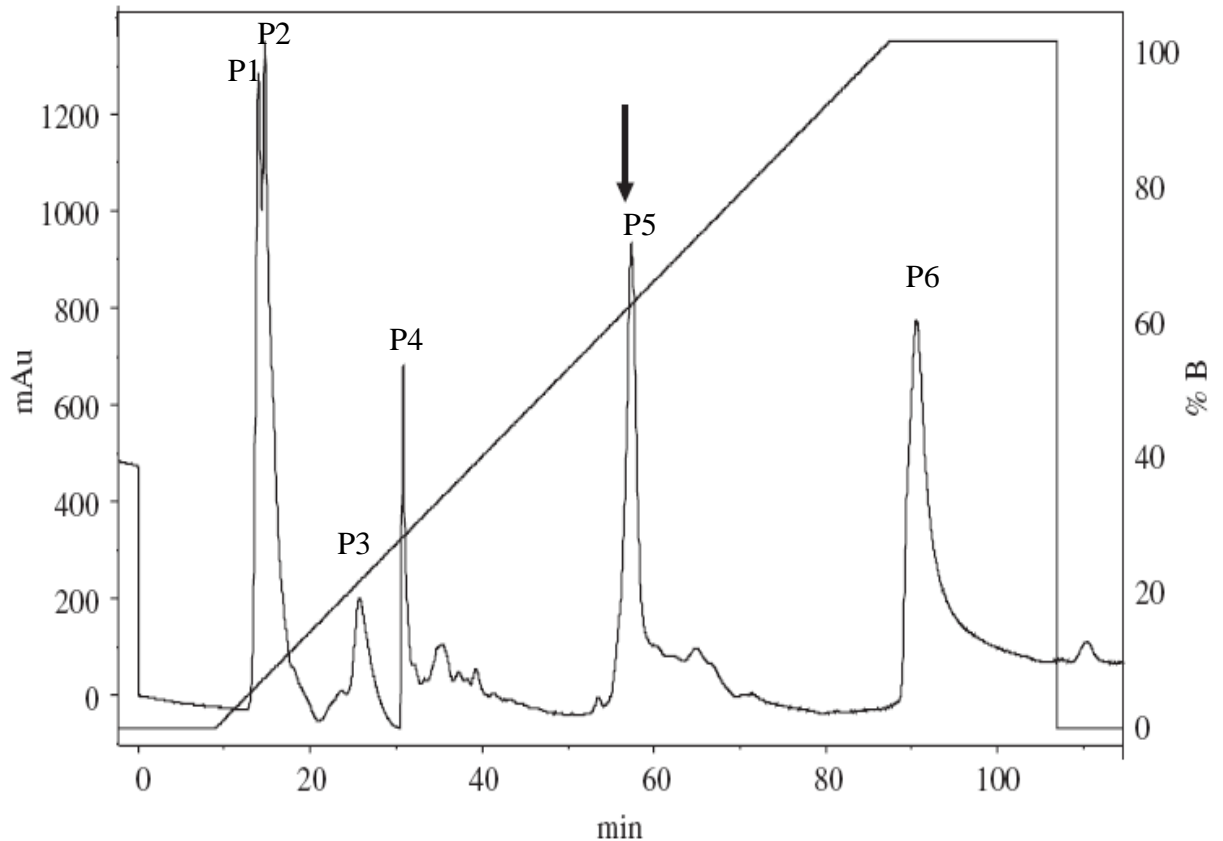
Em 2002, Kalapothakis e colaboradores mostraram a expressão de uma toxina recombinante, denominada LiD1. Esta proteína, expressa em fusão com a β -galactosidase, mostrou-se incapaz de induzir lesão dermonecrótica em coelhos. Neste trabalho, essa proteína foi clonada em outro vetor, o pET 11 A e bactérias da linhagem BL21 DE3 foram utilizadas para a transformação. O clone obtido foi seqüenciado (Araujo, 2005).

Na figura 11 A verificamos amostras coletadas em diferentes tempos de expressão. Após 4 horas de expressão, foi possível observar uma grande quantidade de proteína expressa e por isso esse tempo foi o escolhido.

Após as 4 horas de expressão, a fração solúvel lisada do extrato bacteriano contendo rLiD1 foi submetida à cromatografia de fase reversa em uma coluna C8 semi-preparativa com gradiente de 0 a 100% de acetonitrila para separação das proteínas. Seis picos predominantes (figura 11B) foram obtidos e liofilizados. Para localizar a fração correspondente a proteína recombinante, foi realizado um *dot blot* utilizando o anticorpo policlonal anti-veneno total de *L. intermedia* (Chavez-Olortegui, Zanetti *et al.*, 1998) frente aos 6 picos advindos da cromatografia, como mostra figura 11C. Localizamos reatividade no pico 5, destacado com uma seta (Figura 11B), eluído com 60% de acetonitrila.



(B)



(C)

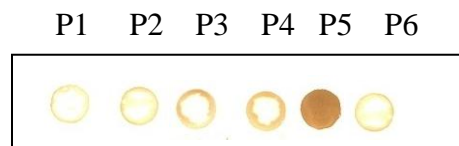


Figura 11- Expressão e Purificação de rLiD1. (A) Eletroforese em gel de poliácridamida a 12,5%. Na primeira canaleta temos o padrão de massa molecular (Multimark- Invitrogen); nas canaletas 1 a 5, temos os diferentes tempos de expressão de rLiD1 (0, 2, 4, 6 e 20 horas). (B) Perfil da cromatografia de fase reversa em coluna semi-preparativa C8, do extrato bacteriano. Os 6 principais picos estão indicados: P1, corresponde ao pico 1; P2, ao pico 2, P3 ao pico 3, P4, ao pico 4, P5, ao pico 5 e P6, ao pico 6. A seta indica a fração reconhecida pelo anticorpo anti-*Loxosceles*, eluída com 60% de acetonitrila. O rendimento da purificação foi de 25,8 mg/ litro de cultura. Fase móvel: Acetonitrila/TFA 0.1%. Fluxo de 5ml/minuto. Comprimento de onda: 280 nm. (C) *Dot blot* com cada um dos picos. Após serem liofilizados, a reatividade de cada um dos picos foi testada frente ao anticorpo anti- *L. intermedia* marcado com peroxidase, na diluição 1:500. Verificamos a reatividade deste anticorpo, na fração correspondente ao pico 5.

Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, mostraram que esta proteína apresenta massa aproximada de 32 kDa (Figura 12A) semelhante a proteínas dermonecróticas do veneno de *Loxosceles*. Um anticorpo monoclonal produzido contra o veneno de *Loxosceles intermedia*(Limab7) com características neutralizantes (Alvarenga, Martins *et al.*, 2003) reconhece, por *Western blot*, rLiD1 (Figura 12B).

Uma massa molecular de 32,758 Da foi encontrada por espectrometria de massa, como mostra a figura 13, e apesar da purificação, ainda detectamos impurezas na faixa de 14,300 Da.

Utilizando o método de dosagem de proteínas de Bradford (1976) obtivemos cerca de 25,8 mg de proteína purificada por litro de cultura expressa.

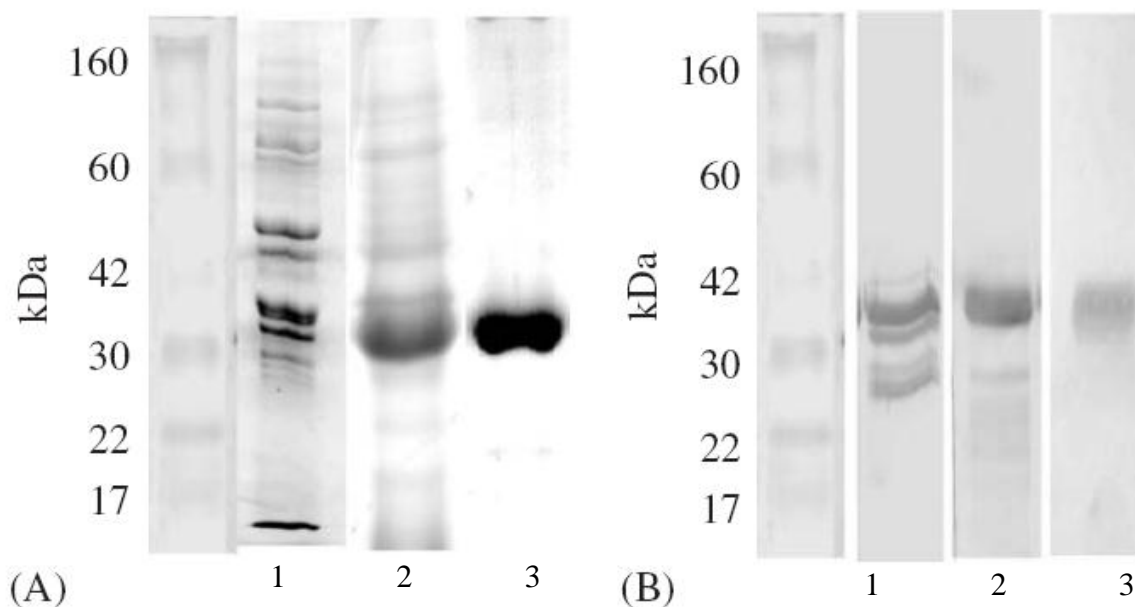


Figura 12- Análise de rLiD1 em Gel de Poliacrilamida e *Western-blot*. (A) Canaleta 1- Veneno bruto de *Loxosceles intermedia*. Canaleta 2- Cultura bacteriana induzida com IPTG. Canaleta 3- rLiD1 purificada, revelada pelo método de coloração pela prata. (B) Análise por *Western blot* destas amostras utilizando o anticorpo monoclonal 7 (mab7).

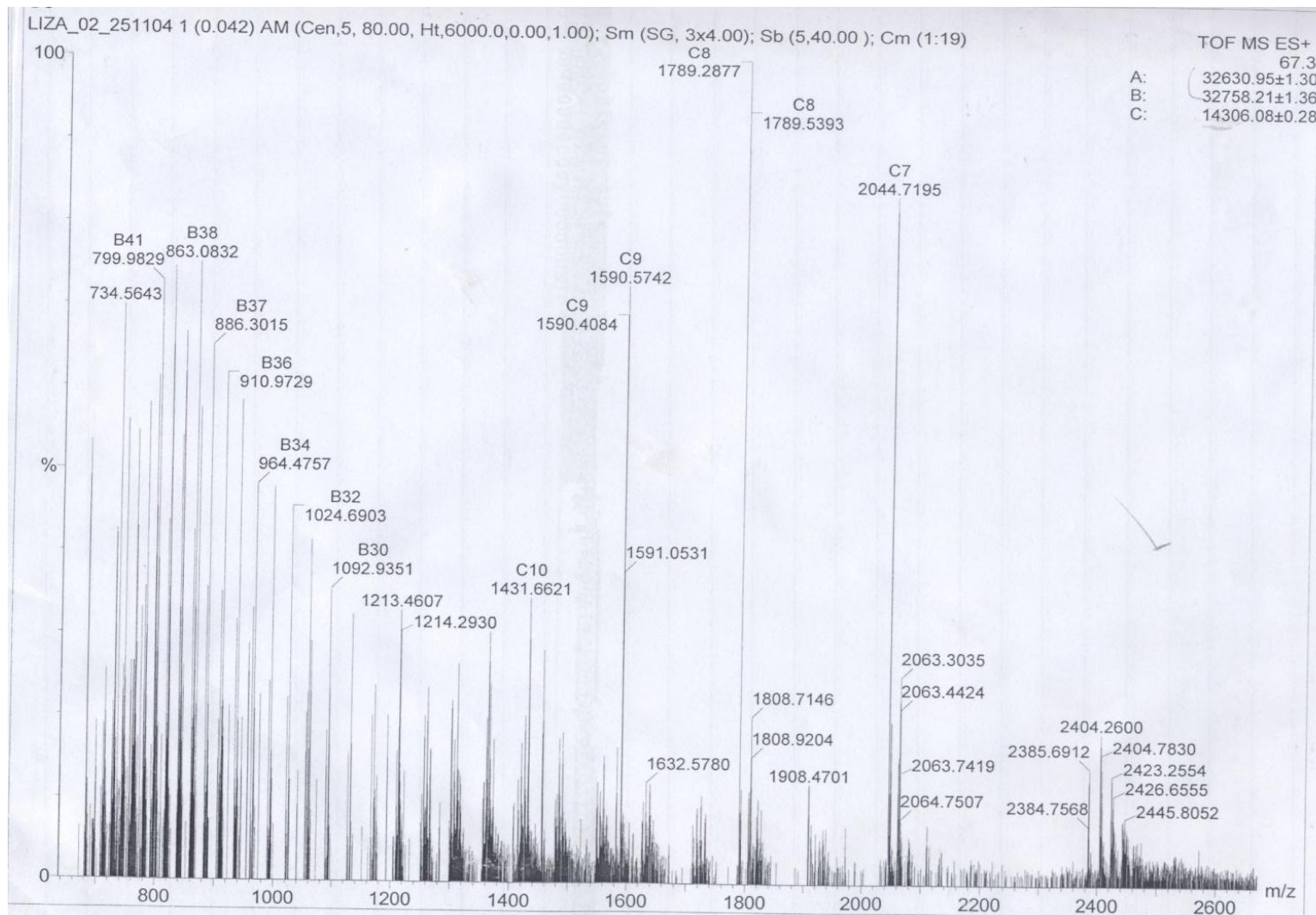


Figura 13 - Espectrometria de massas de rLiD1.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE rLiD1

A capacidade da proteína recombinante induzir lesão dermonecrótica foi observada pela injeção intradérmica no dorso de coelhos previamente depilados, de 10 μg da proteína purificada reduzida e não reduzida (Figura 14A-I,II) em comparação com o veneno de *L. intermedia* (Figura 14A – III), sendo que o controle com PBS não apresentou lesão (Figura 14A– IV).

Para a determinação da dose mínima necrosante, 3,5, 7 e 14 μg (Figura 14B) da proteína purificada foram injetados no dorso de um coelho. A dose mínima necrosante, determinada como a menor concentração de veneno que causa uma lesão dermonecrótica de 1 cm^2 , foi de 7 μg , tanto para a proteína, quanto para o veneno.

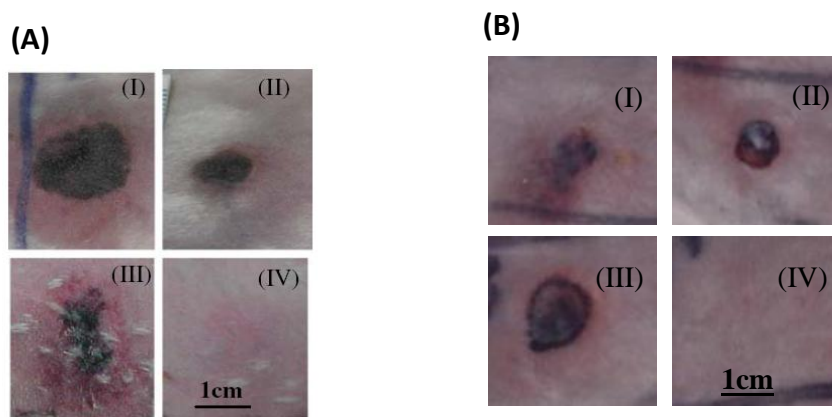


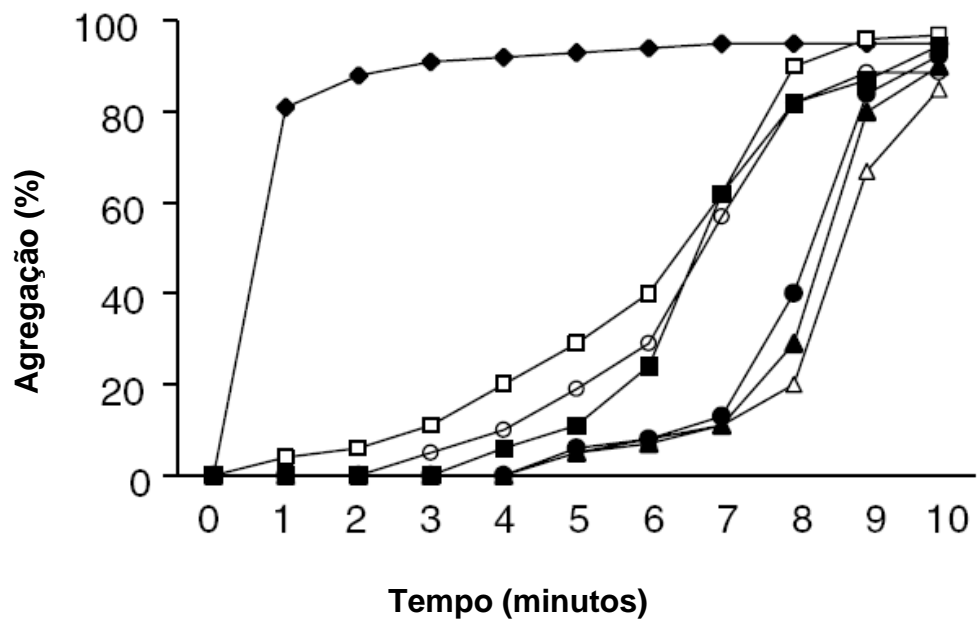
Figura 14 - Atividade dermonecrótica de rLiD1. (A) Coelhos receberam doses i.d. de 10 μg de: I- rLiD1, II-rLiD1 reduzida, III- veneno de *L. intermedia* ou IV- PBS, como controle negativo. (B) Para determinação da dose mínima necrosante (DMN) coelhos receberam i.d. doses de 3,5 μg (I), 7 μg (II) e 14 μg (III) ou PBS (IV), como controle.

A ação de rLiD1 e do veneno de *L. intermedia* foram também investigadas na agregação plaquetária. A Figura 15 A mostra que a proteína recombinante é capaz de induzir a agregação plaquetária dependente da concentração, efeito similar ao produzido pelo veneno.

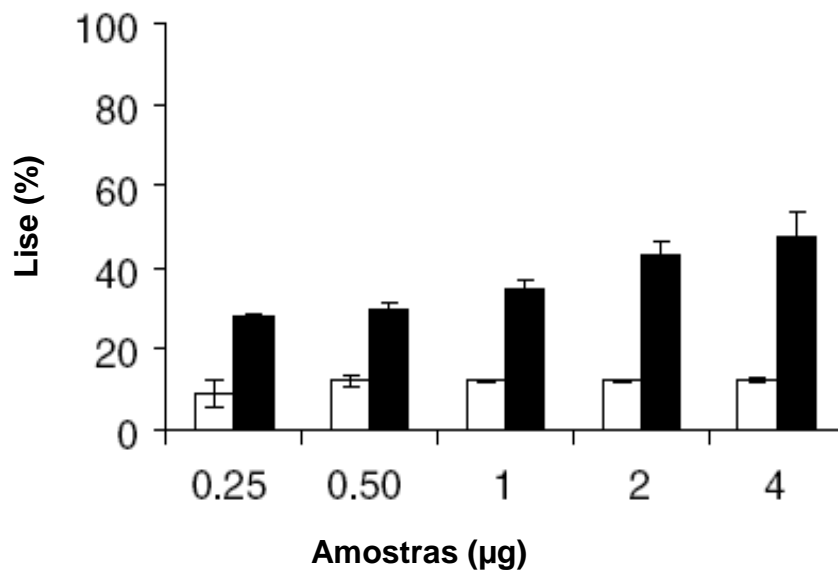
Tambourgi e colaboradores (2004) mostraram que esfingomielinases nativas ou recombinantes isoladas do veneno de *L. intermedia* induzem hemólise em eritrócitos humanos. Desta forma, ao testarmos rLiD1 quanto à sua atividade hemolítica, vimos que esta proteína é pouco hemolítica se comparada com o veneno total, nas concentrações testadas (Figura 15B).

Foi avaliada também a atividade enzimática sobre esfingomielina tanto de rLiD1 quanto do veneno. Como esperado, o veneno total apresentou atividade esfingomielinásica (Figura 15C), no entanto, rLiD1, apresentou uma atividade muito baixa.

(A)



(B)



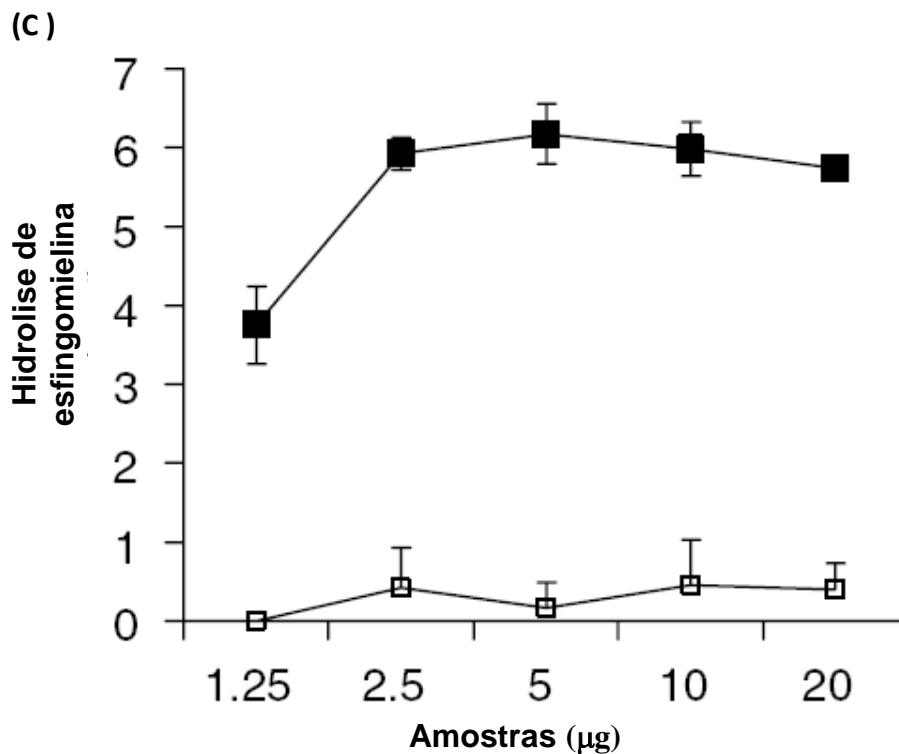


Figura 15 - Caracterização funcional de rLiD1.

(A) Ensaio de Agregação Plaquetária. Plasma rico em plaquetas foi incubado com diferentes quantidades de rLiD1 (1 (Δ), 2 (O) e 4 (\square) μg) ou com o veneno bruto (1 (\blacktriangle), 2 (\bullet) e 4 (\blacksquare) μg) ou com ADP 5 μM (\blacklozenge) como controle positivo.

(B) Atividade hemolítica. Para o ensaio hemolítico, as hemácias foram incubadas com diferentes quantidades de rLiD1 (\square) ou com o veneno de *L. intermedia* (\blacksquare). Em seguida, foram lavadas e incubadas com soro normal humano. Após centrifugação, a leitura a 541 nm foi realizada no sobrenadante. (C) Atividade esfingomielinásica. Esfingomielina-TNPAL foi incubada com diferentes quantidades de rLiD1 (\square) ou veneno de *L. intermedia* (\blacksquare). Após 30 minutos, mediante agitação e incubação à 37°C, a reação foi interrompida, a absorbância determinada e a atividade esfingomielinásica expressa como a hidrólise de esfingomielina-TNPAL em nmol.

4.3 MODELO TRIDIMENSIONAL DE rLiD1

A partir dos dados de cristalografia de raio X, de uma proteína com atividade esfingomielinase D de *L. laeta* (SMase 1), de Murakami e colaboradores (2005), realizamos a modelagem molecular de rLiD1, onde podemos observar o enovelamento desta como TIM-barril (Figura 16), além da presença de 2 pontes dissulfeto, diferente da SMase1 que apresenta somente uma.

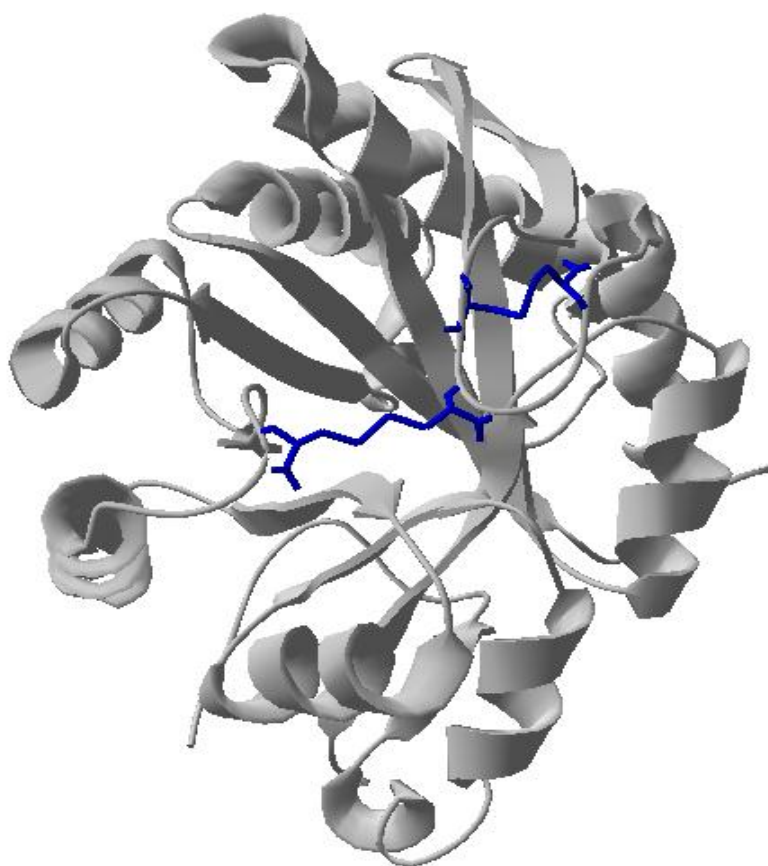


Figura 16- Modelo da estrutura tridimensional de LiD1. Estrutura de TIM-barril mostrando pontes dissulfeto em azul. Obtido por modelagem molecular utilizando o software Modeller 8 versão 1 (Marti-Renom, Stuart *et al.*, 2000) a partir da proteína SMASE 1 (acesso PDB: 1XX1) (Murakami *et al.*, 2005). O programa swiss pdb viewer (Gueix e Peitsch, 1997) foi utilizado para sua visualização.

4.4 ESTUDOS IMUNOLÓGICOS

A habilidade de rLiD1 em induzir uma resposta imune protetora *in vivo* foi avaliada em camundongos Balb/c. Assim, 10 camundongos foram imunizados primeiramente com 0.2 µg de rLiD1 e posteriormente com três doses de 20 µg de rLiD1. Uma semana após a quarta dose, o sangue dos animais foi coletado e o soro analisado em ensaios de ELISA quanto à reatividade individual frente à proteína usada como imunógeno (Figura 17 A). Todos os camundongos apresentaram, com certa variabilidade, imunorreatividade com a proteína recombinante, enquanto que o soro pré-imune, não o fez.

Um ensaio de ELISA (Figura 17B) foi realizado também, para avaliar a reatividade dos soros frente à venenos de diferentes espécies de *Loxosceles* (*L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta*) e também em relação à *Phoneutria nigriventer*, outro gênero de aranha de importância médica no Brasil. Os anticorpos anti-rLiD1 apresentaram reatividade cruzada com os venenos de *Loxosceles*, o que não aconteceu com o veneno de *P. nigriventer*.

A capacidade desses anticorpos presentes no soro de camundongos em neutralizar o veneno de *L. intermedia* foi determinada por ensaios de neutralização *in vivo*.

Os camundongos imunizados foram agrupados aleatoriamente e desafiados com 25 µg do veneno total, o que corresponde a 2,5 DL₅₀. Os experimentos foram realizados 5 semanas após a última imunização, tendo como resultado, a sobrevivência de 75% (3/4) dos camundongos vacinados, enquanto que no grupo não imunizado, todos os camundongos morreram (Tabela 4).

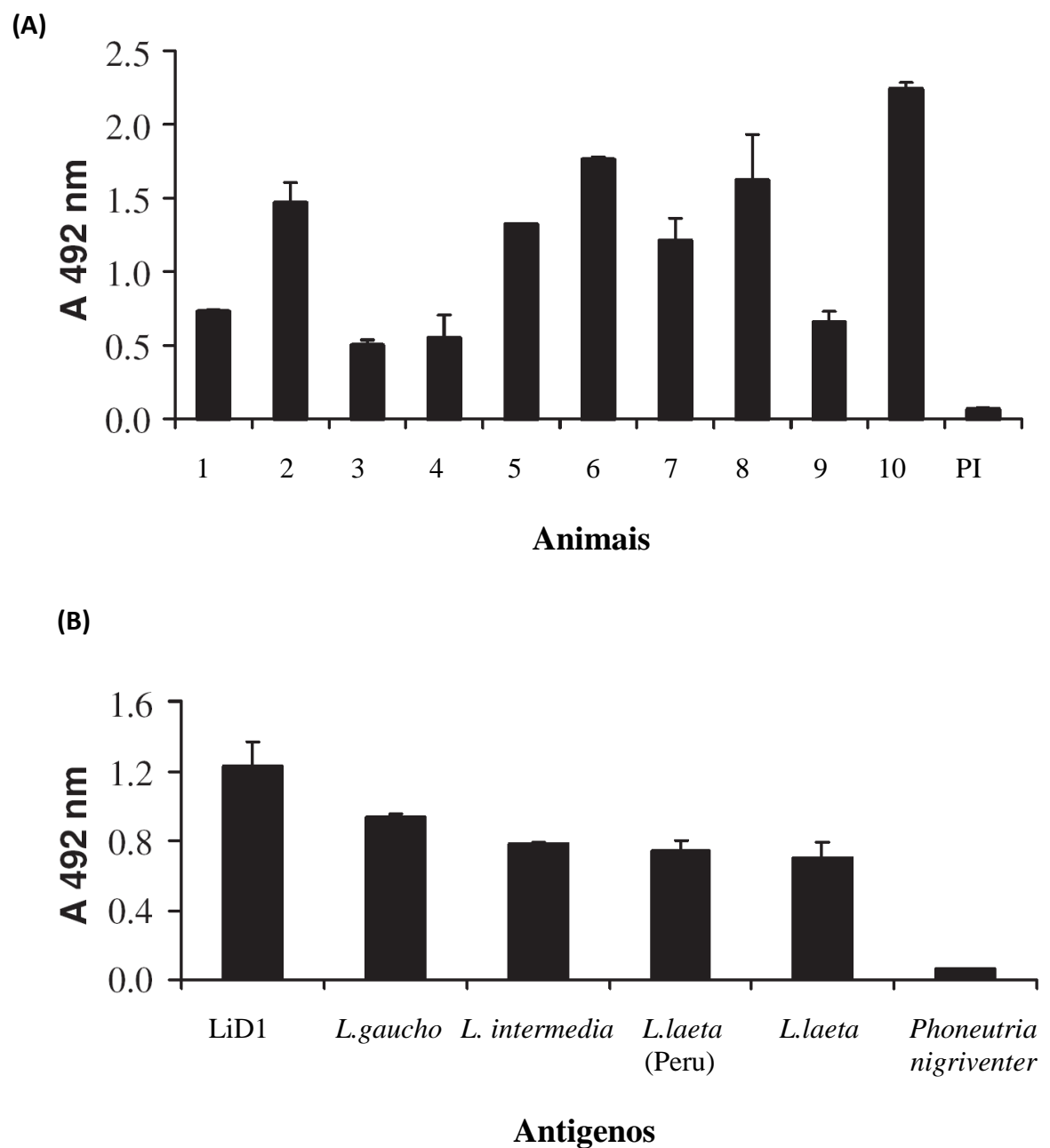


Figura 17- ELISA. (A) Resposta individual de camundongos à imunização com rLiD1. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de LiD1. Foi utilizado soro de camundongo na diluição de 1:100, inclusive soro pré-imune (PI) dos camundongos. (B) Reatividade cruzada dos soros de camundongo anti-LiD1 frente a diferentes venenos de aranha (5 $\mu\text{g/ml}$). A absorbância das amostras foi determinada a 492 nm. Os valores são médias de triplicatas.

Tabela 4 - Experimento de proteção *in vivo*

<i>DL₅₀ (veneno de L. intermedia)/ 20g de camundongo</i>	<i>Camundongos</i>	<i>Sobreviventes/ Desafiados (%)</i>
2,5	Controle	0/4 (0)
2,5	Imunizados	3/4 (75)

Grupos de 4 camundongos receberam doses subcutâneas de 25 µg (2,5 DL50) de veneno de *L. intermedia*. 48 horas após a injeção, os animais sobreviventes foram contados.

4.5 PEPTÍDEOS LINEARES DE rLiD1 E IMUNOENSAIO

Com o intuito de identificar os determinantes antigênicos de rLiD1, responsáveis pela neutralização *in vivo* vista anteriormente, o método de Spot síntese foi utilizado. Foram construídos 90 peptídeos lineares, ou contínuos, a partir da estrutura primária de LiD1. Cada peptídeo é constituído de 15 resíduos de aminoácidos, sendo 12 sobrepostos e 3 inéditos, cobrindo, assim, toda a estrutura primária dessa proteína como representado na Fig. 18A.

Após a síntese, os peptídeos permanecem imobilizados na membrana de celulose, permitindo, desta maneira, os ensaios imunológicos para o reconhecimento dos epitopos.

A ligação dos anticorpos de camundongo anti-rLiD1 com os peptídeos foi detectada pela adição de um segundo anticorpo (IgG anti-camundongo-fosfatase, SIGMA), como mostra a figura 18B. Foi possível localizar uma região que apresentou forte reatividade imunológica, marcada com um retângulo.

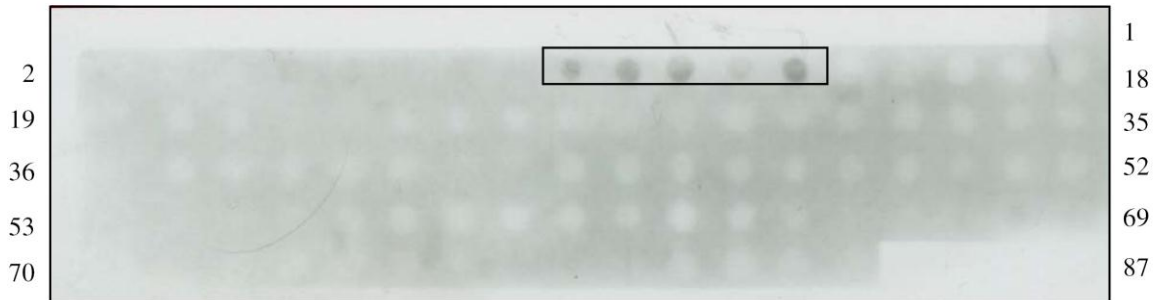
Os cinco peptídeos mais reativos encontram-se na região N-terminal da proteína, correspondentes aos peptídeos 9-13, destacados em amarelo na figura 18 A.

A localização do epitopo (NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP, resíduos 25-51) foi analisada na estrutura tridimensional de rLiD1 (Figura 18C). Esses resíduos, correspondentes à 2 folhas β, compreendem 3 (E³², D³⁴ e H⁴⁸) dos 9 resíduos do sitio ativo de SMase 1 (Murakami *et al.*, 2005).

(A)

1	AGNRRPIWIMGHMVN	46	DLNHYPLIKGFKDQL
2	RRPIWIMGHMVNAIG	47	HYPLIKGFKDQLTKD
3	IWIMGHMVNAIGQID	48	LIKGFKDQLTKDGHP
4	MGHVMNAIGQIDFV	49	GFKDQLTKDGHPPELM
5	MVNAIGQIDFVNLG	50	DQLTKDGHPPELMDKV
6	AIGQIDFVNLGANS	51	TKDGHPPELMDKVGHD
7	QIDFVNLGANSIET	52	GHPPELMDKVGHDVSG
8	EFVNLGANSIETDVS	53	ELMDKVGHDVSGNDD
9	NLGANSIETDVS FDD	54	DKVGHDVSGNDDISD
10	ANSIETDVS FDD NAN	55	GHDFSGNDDISDVGK
11	IETDVS FDD NANPEY	56	FSGNDDISDVGKAYK
12	DVS FDD NANPEYTYH	57	NDDISDVGKAYKKAG
13	FDD NANPEYTYHGIP	58	ISDVGKAYKKAGITG
14	NANPEYTYHGIPCDC	59	VGKAYKKAGITGHIW
15	PEYTYHGIPCDCGRN	60	AYKKAGITGHIWQSD
16	TYHGIPCDCGRNCKK	61	KAGITGHIWQSDGIT
17	GIPCDCGRNCKKYEN	62	ITGHIWQSDGITNCL
18	CDCGRNCKKYENFND	63	HIWQSDGITNCLPRG
19	GRNCKKYENFNDFLK	64	QSDGITNCLPRGLSR
20	CKKYENFNDFLKGLR	65	GITNCLPRGLSRVNA
21	YENFNDFLKGLRSAT	66	NCLPRGLSRVNAAVA
22	FNDFLKGLRSATTPG	67	PRGLSRVNAAVANRD
23	FLKGLRSATTPGNSK	68	LSRVNAAVANRDSAN
24	GLRSATTPGNSKYQE	69	VNAAVANRDSANGFI
25	SATTPGNSKYQEKL	70	AVANRDSANGFINKV
26	TPGNSKYQEKLVLV	71	NRDSANGFINKVYYW
27	NSKYQEKLVLVVF	72	SANGFINKVYYWTV
28	YQEKLVLVVF	73	GFINKVYYWTVDKRS
29	KLVLVVF	74	NKVYYWTVDKRSTTR
30	LVVVF	75	YYWTVDKRSTTRDAL
31	FDLKTGS	76	TVDKRSTTRDALDAG
32	KTGS	77	KRSTTRDALDAGVDG
33	SLYDNQ	78	TTRDALDAGVDGIMT
34	DNQ	79	DALDAGVDGIMTNYP
35	ANDAGK	80	DAGVDGIMTNYPDVI
36	AGK	81	VDGIMTNYPDVI
37	KLAKNLLQ	82	IMTNYPDVI
38	KNLLQ	83	NYPDVI
39	LQHYW	84	DVI
40	YWN	85	TDV
41	NG	86	LNE
42	NG	87	AA
43	RAY	88	KK
44	IV	89	FR
45	SIP	90	RV

(B)



(C)

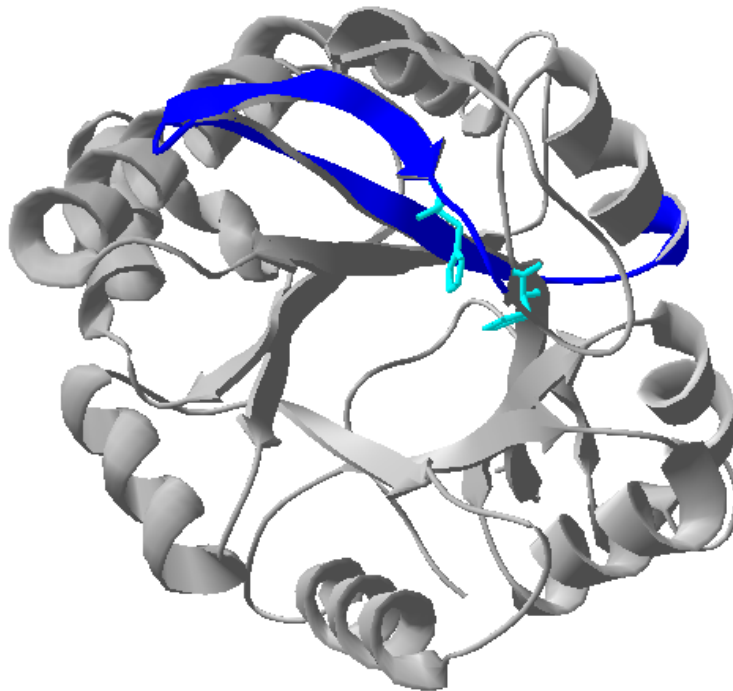


Figura 18- Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de LiD1 com o soro de camundongos anti-rLiD 1. (A) Seqüência dos 90 peptídeos de 15 aminoácidos obtidos a partir da estrutura primária de LiD1. Os peptídeos foram sintetizados pelo método de SPOT síntese. (B) A ligação de anticorpos presentes no soro de camundongo anti-rLiD1 (diluição 1:250) aos peptídeos foi detectada pela adição do conjugado específico (anti-mouse –HRP- Sigma), na diluição de 1:3000. Os peptídeos reativos são: NLGANSIETDVSFDD, ANSIETDVSFDDNAN, IETDVSFDDNANPEY, DVSFDDNANPEYTYH e FDDNANPEYTYHGIP. (C) Localização do epitopo NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP (posição 25-51 de LiD1) no modelo tridimensional de LiD1. A fita beta correspondente ao epitopo localizado esta destacado em azul escuro e as duas histidinas do sitio ativo (H12 e H48) estão marcadas em azul claro.

4.6 SÍNTESE DO PEPTÍDEO E IMUNIZAÇÃO

O peptídeo (NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP) correspondente aos epitopos reativos foi sintetizado de acordo com o método de Merrifield (1969). Após verificação de sua massa através de espectrometria de massa (ESI-TOF), utilizamos esse peptídeo para imunização de 2 coelhos. Para isso, os coelhos receberam 1 dose de 100 µg de peptídeo em adjuvante completo de Freund e outras 3 doses em adjuvante incompleto de Freund. Como controle, outros 2 coelhos foram imunizados com um peptídeo do escorpião *Tityus serrulatus* (KEGYLMDHEGCKLSC).

Observamos que um coelho foi capaz de produzir uma quantidade muito maior de anticorpos específicos em relação ao outro, como mostra a titulação do soro anti-peptídeo (Figura 19). Além disso, os anticorpos anti-peptídeo foram capazes de reconhecer tanto a proteína rLiD1, quanto o veneno de *L. intermedia*.

O soro anti-peptídeo de *Tityus serrulatus* e o soro pré-imune não apresentaram reatividade.

4.7 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO IN VIVO

Tanto os coelhos imunizados com o peptídeo de 27 aminoácidos quanto os outros 2 coelhos imunizados com o peptídeo não relacionado foram desafiados por injeção intradérmica de 10 µg /Kg de animal com a proteína recombinante. Após 72 horas, verificamos a área da lesão dermonecrótica. No coelho 1, verificamos a neutralização de cerca de 60% da lesão dermonecrótica, enquanto que no coelho 2, não houve nenhuma neutralização (Figura 20A), se comparado ao grupo que foi imunizado com o peptídeo de *T. serrulatus*. Em relação à atividade hemorrágica, os dois coelhos também tiveram grandes diferenças na neutralização. Enquanto que o primeiro coelho foi protegido, cerca de 80% da hemorragia, o coelho 2, não apresentou nenhuma proteção (Figura 20 B). Em relação ao edema, o coelho apresentou uma redução de cerca de 40% se comparado ao coelho que foi imunizado com o peptídeo de *T. serrulatus* (Figura 20 C).

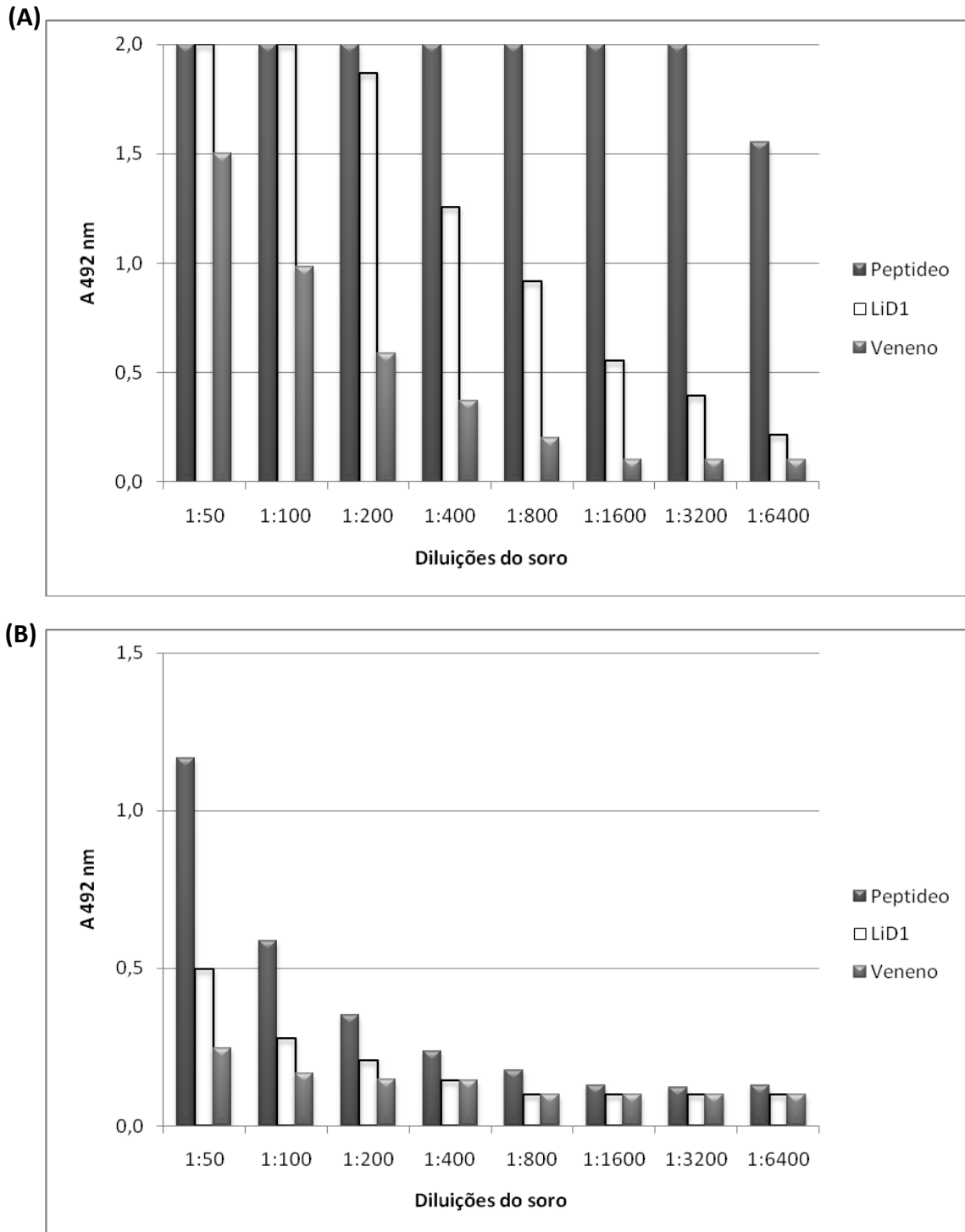


Figura 19- Titulação de anticorpos anti-peptídeo por ELISA. As placas foram sensibilizadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de rLiD1, veneno ou peptídeo. Os soros anti-peptídeo do coelho 1 (A) e coelho 2 (B) foram testados em diluições de 1/50 até 1/6400.

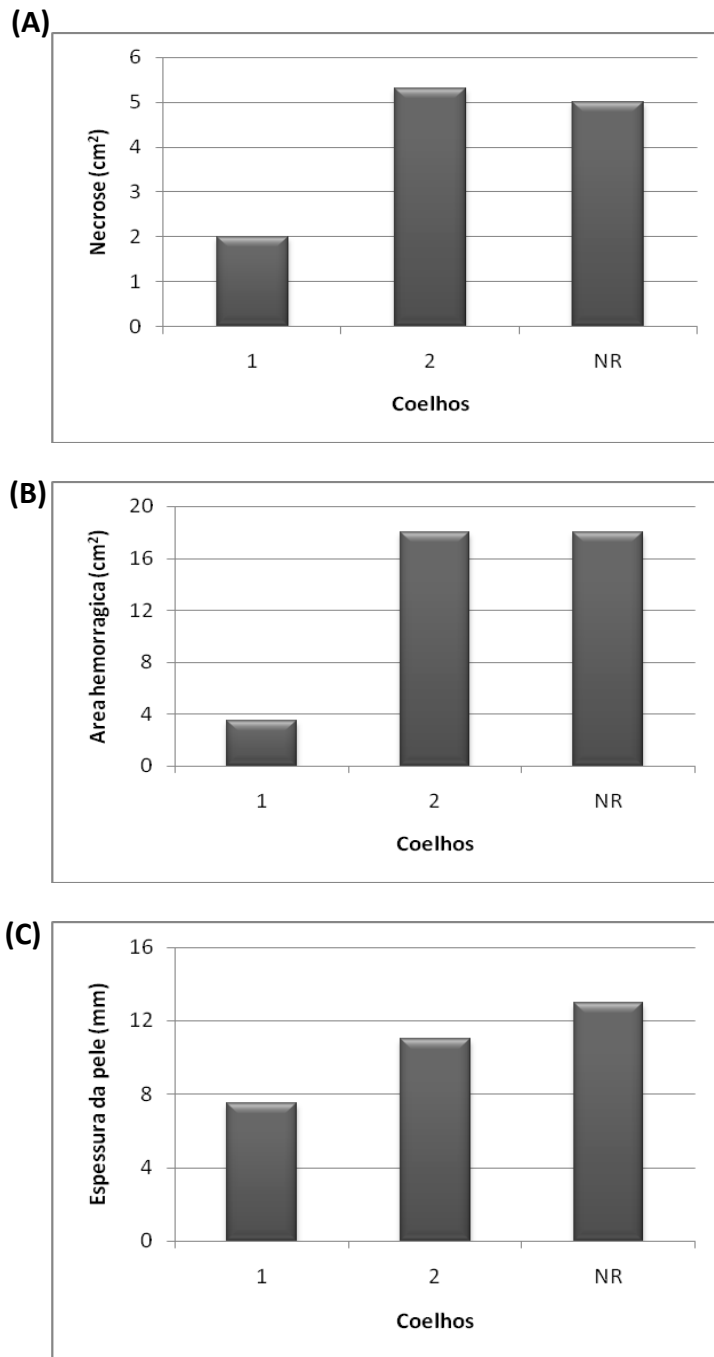


Figura 20 - Avaliação da inibição da área dermonecrótica (A), hemorrágica (B) e edematogênica (C) em relação ao desafio com rLiD após 72 horas. 1 e 2- coelhos imunizados com peptídeo de 27 aminoácidos. NR- coelho imunizado com um peptídeo não relacionado.

4.8 IMUNOENSAIOS

Na busca por outros peptídeos neutralizantes, a reatividade dos 90 peptídeos lineares da rLiD1 (Figura 21A) foi testada utilizando-se soro de cavalo anti-*Loxosceles*, sabidamente neutralizante.

A figura 21B mostra os peptídeos mais reativos (marcados com um retângulo) reconhecidos por este soro, na diluição de 1:2500, detectada pela adição de um segundo anticorpo (IgG anti-cavalo-fosfatase, SIGMA). A Figura 21C mostra a localização dos peptídeos selecionados, na estrutura tridimensional de rLiD1.

4.9 SÍNTESE DOS EPITOPOS

Essas 6 regiões epitópicas foram então sintetizadas segundo o protocolo de Merrifield (1969).

Para a possível ligação dos epitopos a uma proteína carreadora, com o propósito de melhorar sua atividade como imunógeno, foi adicionada às seqüências KYG ou CYG na região N-terminal do peptídeo . A confirmação das seqüências sintetizadas foi obtida por análise de espectrometria de massa (Giusta, 2005).

A tabela 5 mostra a seqüência de cada um dos peptídeos sintetizados, com sua massa molecular teórica e seu ponto isoelétrico. Podemos observar que os peptídeos 3 e 6 têm características básicas, enquanto que os outros peptídeos apresentam características mais ácidas. A tabela 5 mostra a posição destes peptídeos na estrutura primária de rLiD1.

(A)

1 AGNRRPIWIMGHMVN
 2 RRPIWIMGHMVNAIG
 3 IWIMGHMVNAIGQID
 4 MGHMVNAIGQIDFV
 5 MVNAIGQIDFVNLG
 6 AIGQIDFVNLGANS
 7 QIDFVNLGANSIET
 8 EFVNLGANSIETDVS
 9 NLGANSIETDVSFDD
 10 ANSIETDVSFDDNAN
 11 IETDVSFDDNANPEY
 12 DVSFDDNANPEYTYH
 13 FDDNANPEYTYHGIP
 14 NANPEYTYHGIPCDC
 15 PEYTYHGIPCDCGRN
 16 TYHGIPCDCGRNCKK
 17 GIPCDCGRNCKKYEN
 18 CDCGRNCKKYENFND
 19 GRNCKKYENFNDFLK
 20 CKKYENFNDFLKGLR
 21 YENFNDFLKGLRSAT
 22 FNDFLKGLRSATTPG
 23 FLKGLRSATTPGNSK
 24 GLRSATTPGNSKYQE
 25 SATTPGNSKYQEKL
 26 TPGNSKYQEKLVLV
 27 NSKYQEKLVLVFDL
 28 YQEKLVLVFDLKTG
 29 KLVVFDLKTGSLY
 30 LVVFDLKTGSLYDNQ
 31 FDLKTGSLYDNQAND
 32 KTGSLYDNQANDAGK
 33 SLYDNQANDAGKKLA
 34 DNQANDAGKKLAKNL
 35 ANDAGKKLAKNLLQH
 36 AGKKLAKNLLQHYWN
 37 KLAKNLLQHYWNNGN
 38 KNLLQHYWNNGNNGG
 39 LQHYWNNGNNGGRAY
 40 YWNNGNNGGRAYIVL
 41 NGNNGGRAYIVLSIP
 42 NGGRAYIVLSIPDLN
 43 RAYIVLSIPDLNHYP
 44 IVLSIPDLNHYPLIK
 45 SIPDLNHYPLIKGFK
 46 DLNHYPLIKGFKDQL
 47 HYPLIKGFKDQLTKD
 48 LIKGFKDQLTKDGHP
 49 GFKDQLTKDGHPPELM
 50 DQLTKDGHPPELMDKV
 51 TKDGHPPELMDKVGHD
 52 GHPELMDKVGHDFSG
 53 ELMDKVGHDFSGNDD
 54 DKVGHDFSGNDDISD
 55 GHDFSGNDDISDVGK
 56 FSGNDDISDVGKAYK
 57 NDDISDVGKAYKKAG
 58 ISDVGKAYKKAGITG
 59 VGKAYKKAGITGHIW
 60 AYKKAGITGHIWQSD
 61 KAGITGHIWQSDGIT
 62 ITGHIWQSDGITNCL
 63 HIWQSDGITNCLPRG
 64 QSDGITNCLPRGLSR
 65 GITNCLPRGLSRVNA
 66 NCLPRGLSRVNAAVA
 67 PRGLSRVNAAVANRD
 68 LSRVNAAVANRDSAN
 69 VNAAVANRDSANGFI
 70 AVANRDSANGFINKV
 71 NRDSANGFINKVYYW
 72 SANGFINKVYYWTVD
 73 GFINKVYYWTVDKRS
 74 NKVYYWTVDKRSTTR
 75 YYWTVDKRSTTRDAL
 76 TVDKRSTTRDALDAG
 77 KRSTTRDALDAGVDG
 78 TTRDALDAGVDGIMT
 79 DALDAGVDGIMTNYP
 80 DAGVDGIMTNYPDVI
 81 VDGIMTNYPDVIDTV
 82 IMTNYPDVIDTVLNE
 83 NYPDVIDTVLNEAAY
 84 DVITDVLNEAAYKKK
 85 TDVLNEAAYKKKFRV
 86 LNEAAYKKKFRVATY
 87 AAYKKKFRVATYDDN
 88 KKKFRVATYDDNPWV
 89 FRVATYDDNPWVTFK
 90 -RVATYDDNPWVTFKK

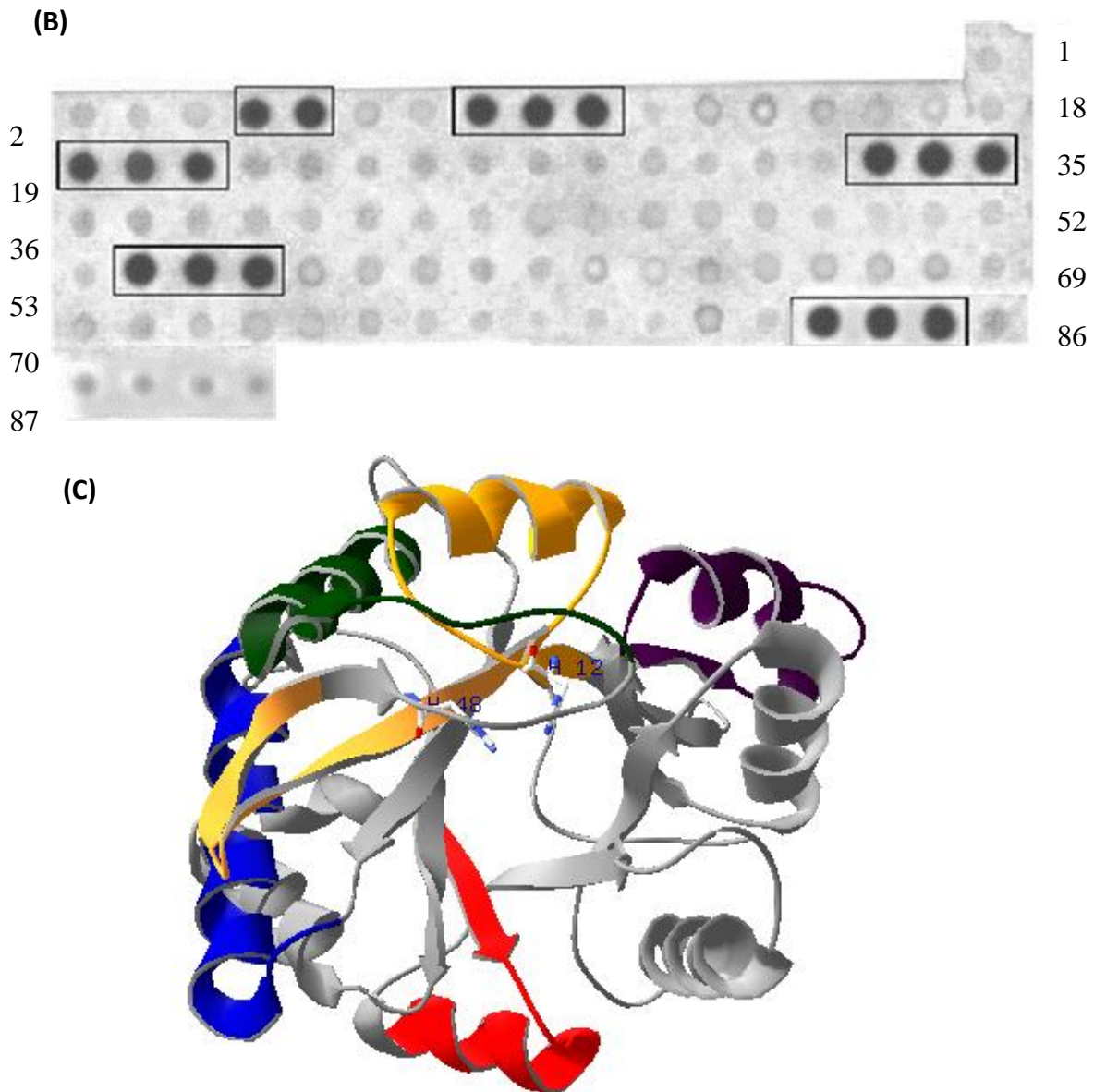


Figura 21 - Reatividade dos peptídeos de 15 aminoácidos com o soro de cavalo antiveneno de *L. intermedia*. (A) Seqüência dos 90 peptídeos de rLiD1. Destacados em amarelo, os peptídeos reativos com o soro anti-*L. intermedia*. (B) O soro de cavalo imune foi usado na diluição 1:2500, as condições da reação foram feitas segundo o protocolo descrito em materiais e métodos. (C) Localização dos peptídeos localizados com o soro de cavalo anti-*L. intermedia*. Em laranja, os peptídeos 5 e 6, peptídeos 9-11, em verde, os peptídeos 19- 21, em azul, os peptídeos 33- 35, em vermelho, os peptídeos 54-56, em roxo, os peptídeos 83- 85.

Tabela 5 - Peptídeos Sintetizados

<i>Peptídeos</i>	<i>Seqüência</i>	<i>MM</i>	<i>pI</i>	<i>Posição</i>	<i>Resíduos (n°)</i>
1	KYGMVNAIGQIDEFVNLG	1966.68	4.37	5	13-27
2	KYGIETDVSFDDNANPEY	2077.15	3.77	11	31-45
3	CYGSKKYENFNDFLKGLR	2182.48	9.05	20	58-72
4	CYGDNQANDAGKKLAKNL	1943.97	4.20	34	100-114
5	KYGDKVGHDFSGNDDISD	2000.25	3.93	54	160-174
6	CYGNYPDVITDVLNEAAY	2190.50	9.05	83	247-261

Seqüência de peptídeos reativos com o soro de cavalo antiveneno de *L. intermedia*. Em cada seqüência foi adicionada uma região de CYG ou KYG para posterior carregamento. Na tabela é mostrado também a massa molecular (MM), ponto isoelétrico (PI), a posição entre os 90 peptídeos sintetizados e a localização na estrutura primária de rLiD1 de cada um dos peptídeos.

4.10 IMUNIZAÇÃO COM rLiD1 E SEUS EPITOPOS

Com o objetivo de verificar a imunogenicidade de rLiD1, de cada um dos epitopos acima sintetizados e da combinação de rLiD e dos epitopos sintéticos, um esquema de imunização foi desenvolvido em coelhos, como mostrado na tabela 2. Assim sendo, 5 grupos contendo 2 coelhos cada, receberam com intervalos de 15 ou 7 dias, 4 doses de rLiD1, de peptídeos ou das duas amostras. O grupo 1 recebeu 4 doses de 50 µg de LiD1 em adjuvante de Freund (a primeira dose em adjuvante completo e as subseqüentes em adjuvante incompleto). Enquanto que o grupo 5 recebeu as 4 doses de peptídeos, contendo 20 µg de cada um dos peptídeos, resultando no final de 120 µg de todos os peptídeos, também em adjuvante de Freund completo e incompleto. Os outros grupos receberam, tanto proteína, quanto peptídeos, como mostra a tabela 2.

Após 1 semana da ultima dose, o sangue dos coelhos foi coletado por punção auricular e o soro submetido a ensaios de ELISA para verificar a produção de anticorpos específicos.

A reatividade do soro de cada coelho frente à rLiD1, foi verificada, em diferentes diluições. Todos os grupos apresentaram anticorpos anti-proteína recombinante (Figura 22A). Assim, nos grupos 1 e 2, a diluição do soro que apresentou densidade ótica (DO) de 1.0, foi 1:3200. No grupo 3, foi 1:800, enquanto que nos grupos 4 e 5, a diluição foi de 1:400.

Dois meses depois, continuamos a observar altos níveis de anticorpos frente a proteína recombinante (Figura 22B).

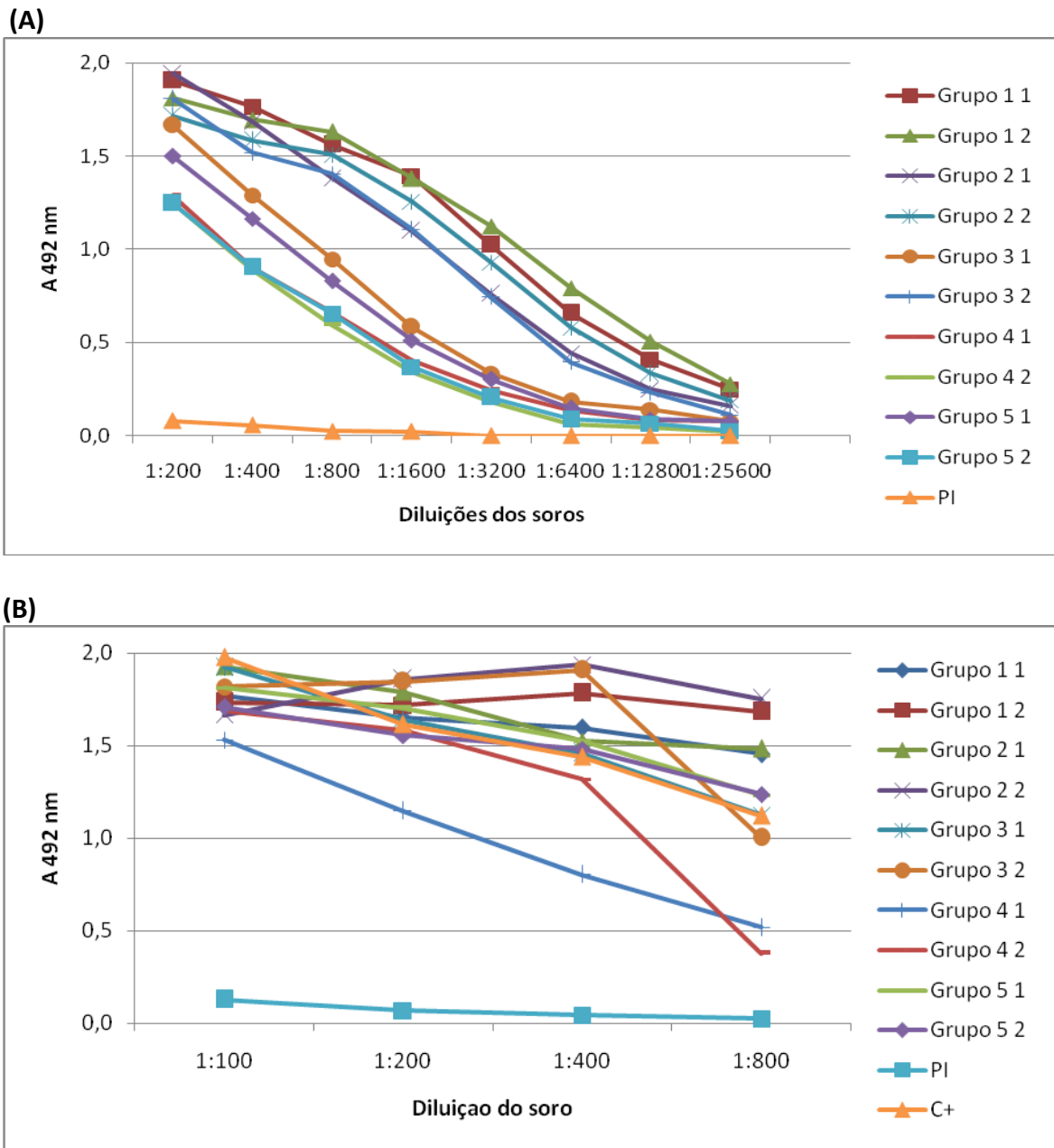


Figura 22- Titulação de anticorpos anti-peptídeos e anti-rLiD1 frente à rLiD1 por ELISA. (A) As placas foram sensibilizadas com 5 µg/ml de LiD1 e o soro dos diferentes grupos de estudo foram testados em diluições desde 1/200 à 1/25600. O controle negativo foi feito com o soro pré-imune (PI). (B) As diluições de 1/100 a 1/800 foram testadas 2 meses após o fim do esquema de imunização. O controle negativo foi feito com o soro pré-imune (PI) e o controle positivo (C+) foi feito com o soro antiveneno de *L. intermedia*.. (Grupo 1 1 –significa grupo 1, coelho 1).

Todos os soros apresentaram reatividade frente aos peptídeos, no entanto menor se comparada à reatividade observada em relação a proteína (Figura 23). O grupo 5, o soro mais reativo, apresentou na DO de 1.0, a diluição de 1:400. Os dois animais dos outros grupos apresentaram uma grande variação na produção de anticorpos.

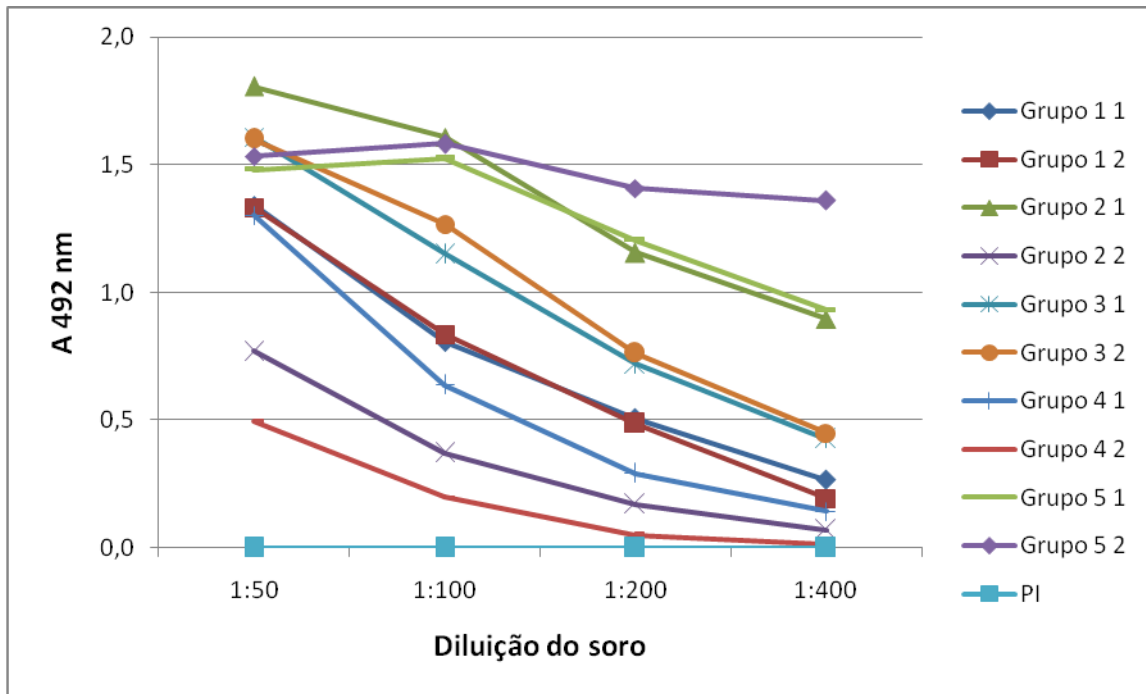


Figura 23- Titulação de anticorpos anti-peptídeos e anti-LiD1 frente aos peptídeos. As placas foram sensibilizadas com 10 µg/ml de peptídeos e o soro dos diferentes grupos de estudo foram testados em diluições de 1/50 até 1/400. O controle negativo foi feito com o soro pré-imune (PI). (Grupo 1 1 – significa grupo 1, coelho 1).

Com o objetivo de investigar se todos os peptídeos foram ou não imunogênicos, um ELISA foi realizado com cada um deles. Assim, 1 µg/poço de cada peptídeo e do total de peptídeos foram utilizados. Como observado na figura 24 A, o soro dos animais do grupo 1, ou que possuem anticorpos anti- rLiD1 foi reativo principalmente com os peptídeos 1 e 3. Enquanto que no grupo 5, que apresentam anticorpos anti-peptídeos, os peptídeos 3 e 5 mostraram-se mais reativos, ou mais imunogênicos. Analisando a seqüência do peptídeo 3 (CYGSKKYENFNDFLKGLR) percebemos que este apresenta características básicas, que sabidamente facilitam a ligação de peptídeos em placas de polipropileno.

A fim de verificar se a reatividade do peptídeo 3 foi maior devido à sua maior fixação na placa de ELISA ou não, um ELISA de competição foi realizado. A placa foi sensibilizada com 5 µg/ml de rLiD1 e o soro anti-*pool* de peptídeos (grupo 5) na diluição de 1/100 antes de ser adicionado à placa foi incubado com 1 µg de cada peptídeo e após, adicionado à placa. Como podemos ver na figura 24B, o peptídeo 3 inibiu de 90 a 100% a ligação do soro anti-peptídeo à proteína recombinante. Esses resultados nos mostram que o peptídeo 3 foi o peptídeo mais imunogênico, dentro todos os peptídeos selecionados. Esse peptídeo localiza-se em uma alfa-hélice próxima do sitio ativo da proteína (Figura 25).

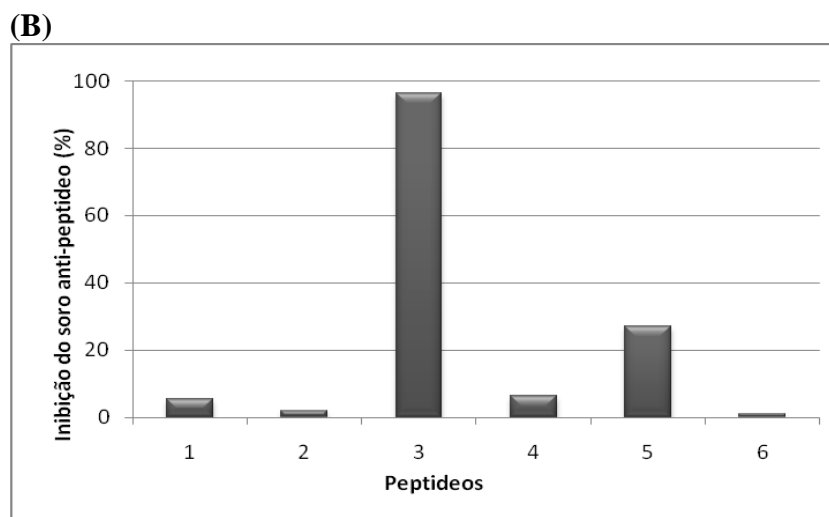
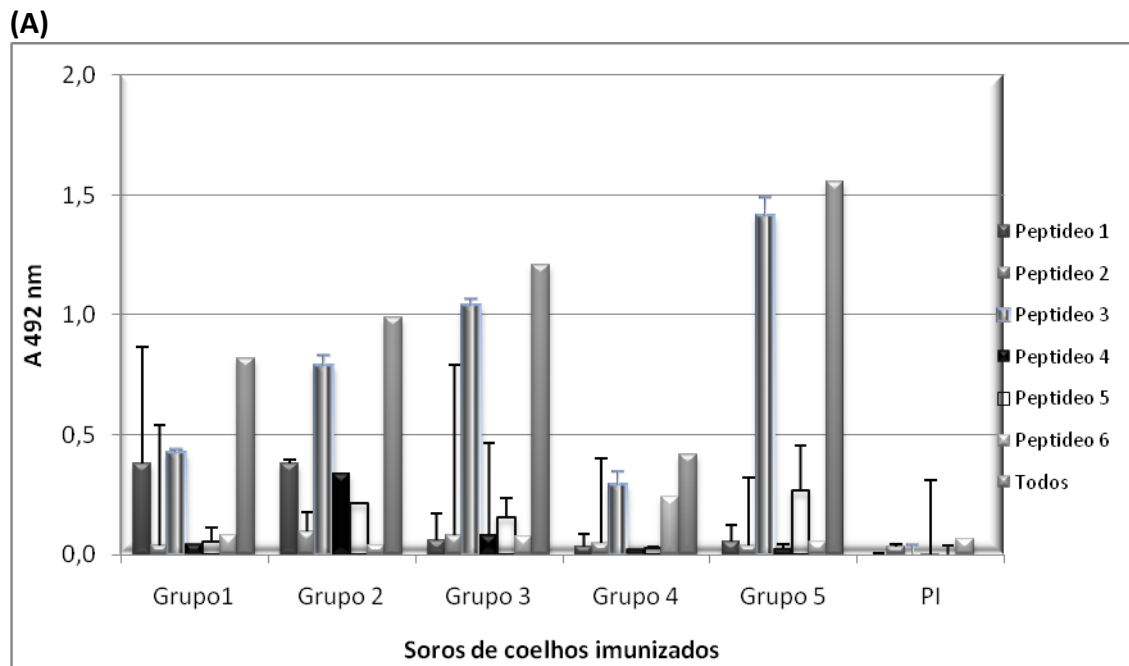


Figura 24 – ELISA para verificação da imunogenicidade dos peptídeos. (A) ELISA frente aos diferentes peptídeos. A placa foi sensibilizada com 10 $\mu\text{g/ml}$ de cada um dos 6 peptídeos. O soro de cada um dos grupos foi testado na diluição de 1/100 frente a cada um dos peptídeos. O controle negativo foi feito com o soro pré-imune (PI). (B) ELISA de competição. A placa foi sensibilizada com 5 $\mu\text{g/ml}$ de rLiD1 e o soro anti-*pool* de peptídeos (grupo 5) na diluição de 1/100 antes de ser adicionado à placa foi incubado com 1 μg de cada peptídeo e após, adicionado à placa. A porcentagem de inibição da ligação do soro à rLiD1 foi dada levando-se em consideração como 100% a leitura a 492 nm dada pelo soro anti-*pool* de peptídeos sem prévia incubação com nenhum dos peptídeos.

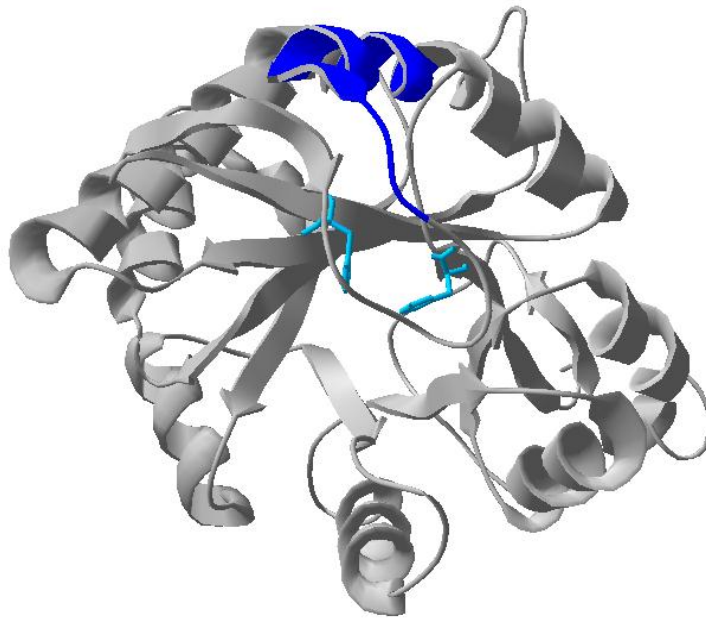


Figura 25 - Localização do peptídeo 3 (SKKYENFNDFLKGLR) na estrutura tridimensional de rLiD1. A α -hélice correspondente ao peptídeo 3 esta marcada em azul escuro e as histidinas do sitio ativo estão marcadas em azul claro.

Quando comparamos a reatividade dos soros dos diferentes grupos frente à venenos, percebemos que o soro anti-LiD1rec reconhece o veneno de *Loxosceles intermedia*, bem como o de *L. gaucho* e de *L. laeta*, o que não acontece com o veneno de *Tityus serrulatus*. Por outro lado, o soro anti-peptídeos (G5) reconhece apenas fracamente os venenos da aranhas do gênero *Loxosceles* (Figura 26).

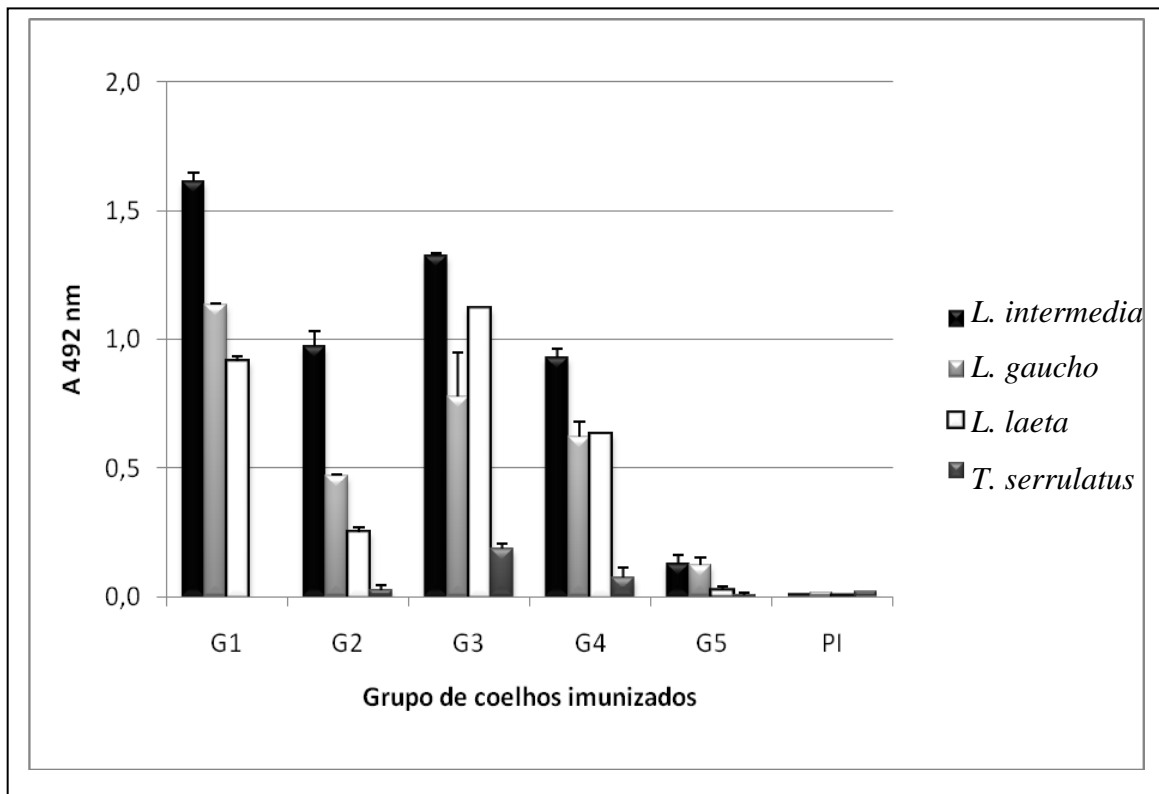


Figura 26 - Reatividade de diferentes venenos frente ao soro dos diferentes grupos de coelhos imunizados. Ensaio de ELISA foram realizados sensibilizando placas com diferentes antígenos (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *T. serrulatus*) na concentração de 5 µg/ml. O soro dos coelhos dos diferentes grupos foi testado na diluição de 1:200.

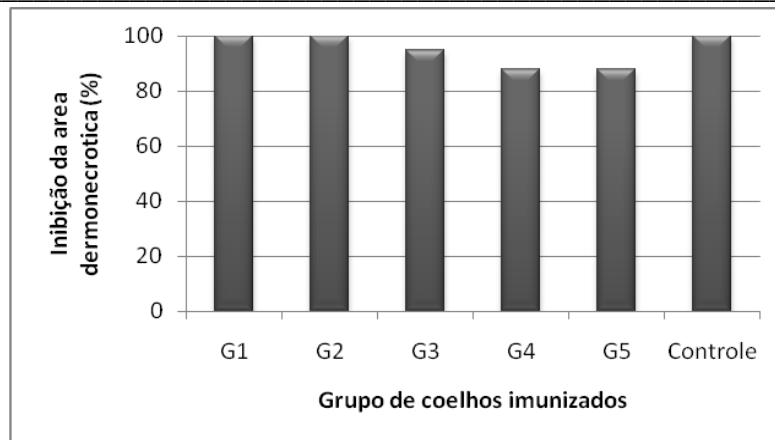
4.11 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO “IN VITRO”

Para a caracterização dos anticorpos anti-peptídeos e anti-proteína foram realizados ensaios *in vitro* com esses anticorpos, avaliando o potencial neutralizante destes frente à proteína recombinante.

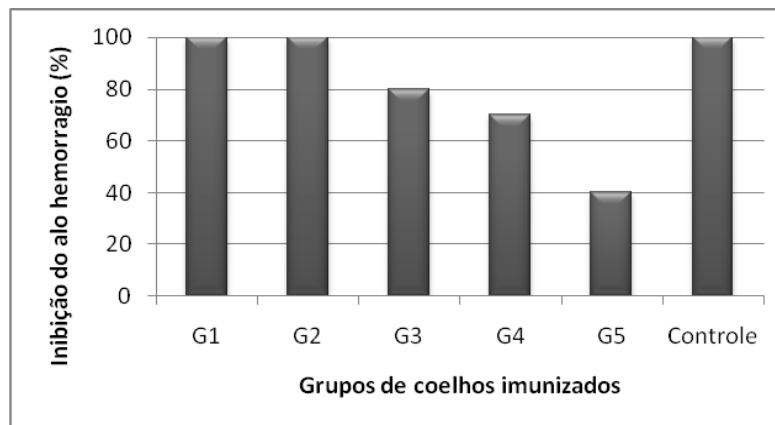
O ensaio de neutralização foi realizado incubando-se 10 µg de rLiD1 com as IgGs previamente purificadas e quantificadas dos grupos imunizados estudados. Além disso, IgGs de cavalo anti- *L. intermedia* foram utilizadas como controle positivo pois elas são sabidamente neutralizantes.

Foi constatado, após 72 horas de observação, que tanto os anticorpos anti-peptídeos quanto anti-proteína foram capazes de induzir neutralização dos efeitos dermonecróticos (80 e 100% respectivamente - Figura 27A). Já, a neutralização por IgGs anti-peptídeos do halo hemorrágico e do edema foram de 40%, enquanto que os efeitos neutralizantes de IgGs anti-proteína foram de 100% em relação ao halo hemorrágico e 70% em relação ao edema, sendo que nem mesmo o soro anti-veneno foi capaz de neutralizar completamente o efeito edematogênico (Figura 27B e 27 C).

(A)



(B)



(C)

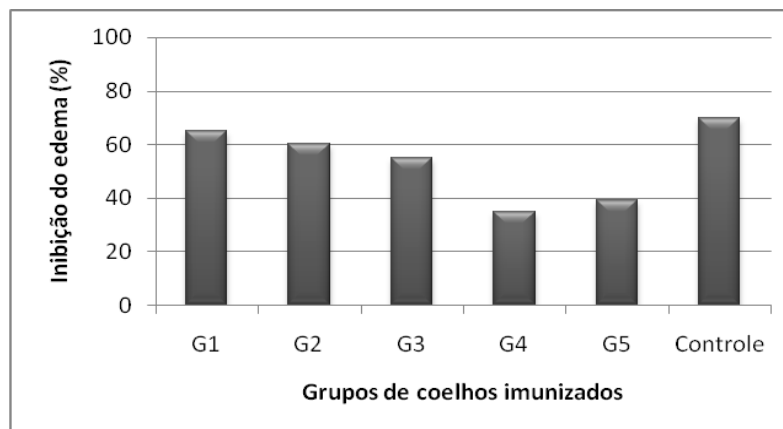


Figura 27 - Avaliação da inibição das atividades necróticas, hemorrágicas e edematogênicas mediante incubação de rLiD1 com anticorpos dos diferentes grupos. 300 µg de IgG de cada um dos grupos foram previamente incubadas com rLiD1 por 1 hora à 37 °C. Em seguida, as amostras foram injetadas no dorso de coelhos e as medidas realizadas 72 horas após. O controle foi feito com IgG de cavalo anti-fração dermonecrotica. O ensaio foi realizado em duplicata.

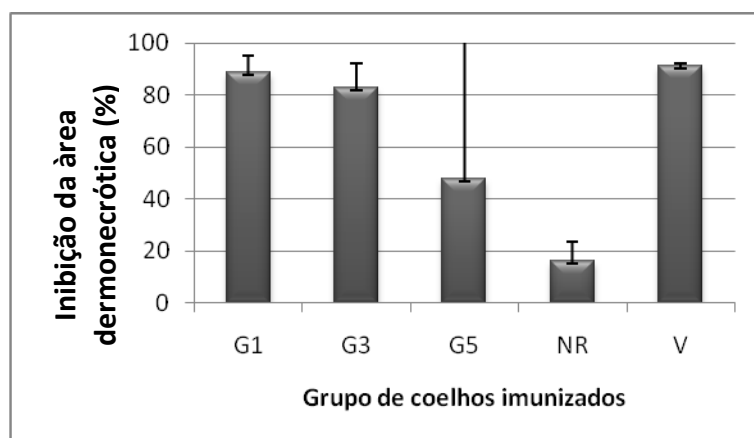
4.12 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO “IN VIVO”

A fim de melhor avaliar a capacidade de neutralização desses anticorpos, experimentos *in vivo*, foram realizados. Para tal, os grupos 1, 3 e 5 foram utilizados. Além destes grupos, foram feitos grupos controle: um imunizado com o veneno de *L. intermedia* e outro imunizado com um peptídeo não relacionado de *T. serrulatus* (KEGYLMDHEGCKLSC).

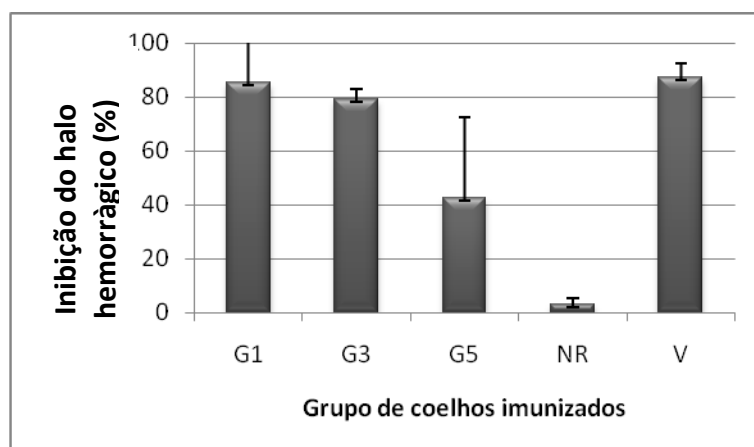
Após 72 horas, foi visto que o grupo imunizado com o veneno (V) e os grupos imunizados com rLiD1 (G1) e com rLiD1 e peptídeos (G3), inibiram mais de 90% da lesão dermonecrótica. Já o grupo imunizado com a mistura de peptídeos (G5), inibiu cerca de 60% a lesão, apresentando uma grande diferença individual. O grupo imunizado com o peptídeo não relacionado (NR) inibiu cerca de 12 % da lesão (Figura 28A).

Em relação à atividade hemorrágica, resultados similares foram observados (Figura 28 B). Quanto à inibição do edema, percebemos um menor efeito neutralizante em todos os grupos, sendo que até mesmo o grupo imunizado com o veneno de *L. intermedia* foi incapaz de neutralizar eficientemente o efeito edematogênico incitado por rLiD1, sendo os grupos imunizados com rLiD1 e rLiD1 mais peptídeos mais eficiente na neutralização deste efeito (Figura 28 C).

(A)



(B)



(C)

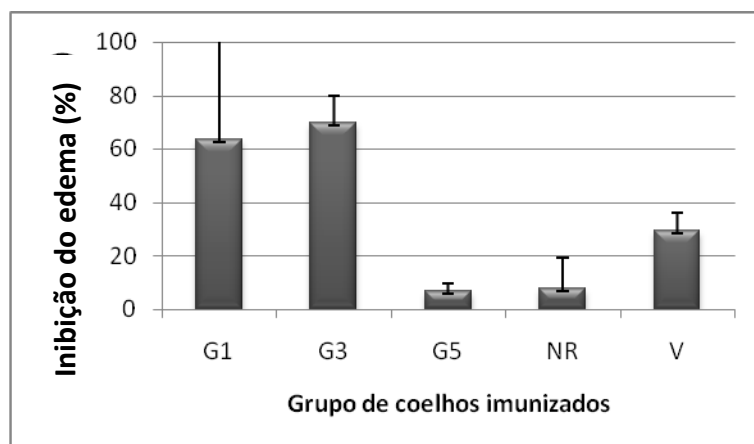


Figura 28 - Avaliação in vivo da inibição da area dermonecrotica, halo hemorrágico e edema dos grupos imunizados frente ao desafio com rLiD. G1- Coelhos imunizados com rLiD1; G3- coelhos imunizados com rLiD1; G5- coelhos imunizados com *pool* de peptídeos; NR- Coelhos imunizados com peptídeo 4 (Ts VII) não relacionado (KEGYLMDHEGCKLSC); V- coelhos imunizados com veneno total de *Loxosceles intermedia*.

4.13 LOCALIZAÇÃO DOS EPITOPOS ANTI-RLID1 E ANTI-PEPTIDEOS

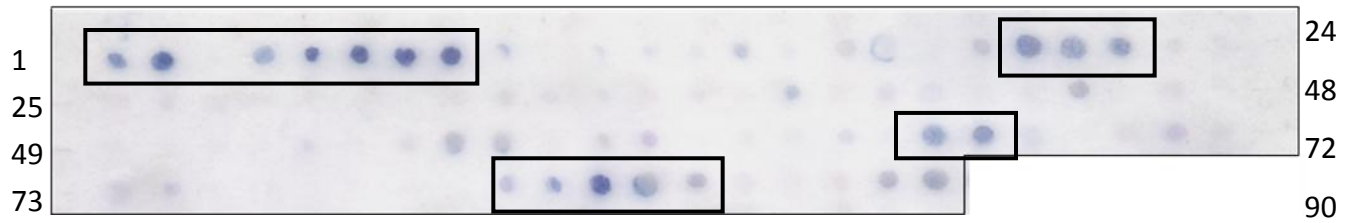
Testamos a reatividade destes anticorpos anti-LiD1rec de coelho frente aos 90 peptídeos que cobrem a sequência de rLiD1. Percebemos que este anticorpo neutralizante reconhece os peptídeos 5, 20 e 83, os mesmo reconhecidos pelo soro de cavalo anti-Loxoscélico (Figura 21), além também de reconhecerem os peptídeos 1-2 e 66-67 (Figura 29 A e 29 B). E, o soro anti-peptídeo reconhece somente os peptídeos 17-22 (Figura 29C), corroborando nossos resultados de ELISA.

(A)

1 AGNRRPIWIMGHMVN
 2 RRPIWIMGHMVNAIG
 3 IWIMGHMVNAIGQID
 4 MGHMVNAIGQIDFV
 5 MVNAIGQIDFVNLG
 6 AIGQIDFVNLGANS
 7 QIDFVNLGANSIET
 8 EFVNLGANSIETDVS
 9 NLGANSIETDVSFDD
 10 ANSIETDVSFDDNAN
 11 IETDVSFDDNANPEY
 12 DVSFDDNANPEYTYH
 13 FDDNANPEYTYHGIP
 14 NANPEYTYHGIPCDC
 15 PEYTYHGIPCDCGRN
 16 TYHGIPCDCGRNCKK
 17 GIPCDCGRNCKKYEN
 18 CDCGRNCKKYENFND
 19 GRNCKKYENFNDFLK
 20 CKKYENFNDFLKGLR
 21 YENFNDFLKGLRSAT
 22 FNDFLKGLRSATTPG
 23 FLKGLRSATTPGNSK
 24 GLRSATTPGNSKYQE
 25 SATTPGNSKYQEKL
 26 TPGNSKYQEKLVLV
 27 NSKYQEKLVLVFDL
 28 YQEKLVLVFDLKTG
 29 KLVVFDLKTGSLY
 30 LVVFDLKTGSLYDNQ
 31 FDLKTGSLYDNQAND
 32 KTGSLYDNQANDAGK
 33 SLYDNQANDAGKKLA
 34 DNQANDAGKKLAKNL
 35 ANDAGKKLAKNLLQH
 36 AGKKLAKNLLQHYWN
 37 KLAKNLLQHYWNGN
 38 KNLLQHYWNGNNGG
 39 LQHYWNGNNGGRAY
 40 YWNGNNGGRAYIVL
 41 NGNNGGRAYIVLSIP
 42 NGGRAYIVLSIPDLN
 43 RAYIVLSIPDLNHYP
 44 IVLSIPDLNHYPLIK
 45 SIPDLNHYPLIKGFK

46 DLNHYPLIKGFKDQL
 47 HYPLIKGFKDQLTKD
 48 LIKGFKDQLTKDGHP
 49 GFKDQLTKDGHPPELM
 50 DQLTKDGHPPELMDKV
 51 TKDGHPPELMDKVGHD
 52 GHPPELMDKVGHDFSG
 53 ELMDKVGHDFSGNDD
 54 DKVGHDFSGNDDISD
 55 GHDFSGNDDISDVGK
 56 FSGNDDISDVGKAYK
 57 NDDISDVGKAYKKAG
 58 ISDVGKAYKKAGITG
 59 VGKAYKKAGITGHIW
 60 AYKKAGITGHIWQSD
 61 KAGITGHIWQSDGIT
 62 ITGHIWQSDGITNCL
 63 HIWQSDGITNCLPRG
 64 QSDGITNCLPRGLSR
 65 GITNCLPRGLSRVNA
 66 NCLPRGLSRVNAAVA
 67 PRGLSRVNAAVANRD
 68 LSRVNAAVANRDSAN
 69 VNAAVANRDSANGFI
 70 AVANRDSANGFINKV
 71 NRDSANGFINKVYYW
 72 SANGFINKVYYWTV
 73 GFINKVYYWTVDKRS
 74 NKVYYWTVDKRSTTR
 75 YYWTVDKRSTTRDAL
 76 TVDKRSTTRDALDAG
 77 KRSTTRDALDAGVDG
 78 TTRDALDAGVDGIMT
 79 DALDAGVDGIMTNYP
 80 DAGVDGIMTNYPDVI
 81 VDGIMTNYPDVIDTV
 82 IMTNYPDVIDTVLNE
 83 NYPDVIDTVLNEAAY
 84 DVITDVLNEAAYKKK
 85 TDVLNEAAYKKKFRV
 86 LNEAAYKKKFRVATY
 87 AAYKKKFRVATYDDN
 88 KKKFRVATYDDNPWV
 89 FRVATYDDNPWVTFK
 90 VATYDDNPWVTFKK

(B)



(C)



Figura 29 - Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de LiD1 (A) com o soro de coelho anti-rLiD 1 (B) e com soro de coelho anti-peptídeos (C). A ligação de anticorpos de coelho anti-rLiD1 e anti-peptídeo (diluição 1:500) aos peptídeos foi detectada por um anticorpo secundário de coelho ligado a fosfatase (diluição 1:2000).

4.14 REATIVIDADE DO SORO ANTI- rLiD1 FRENTE A OUTRAS PROTEÍNAS DO

VENENO DE *L. INTERMEDIA*

Com o objetivo de verificar a reatividade do soro anti-LiD1rec frente a diferentes proteínas do veneno de *L. intermedia*, membranas de spot com diferentes seqüências foram sintetizadas.

Em relação a LiRecDT2 (Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2006), os peptídeos mais reativos foram os: 1,2, 5-8, 19-20, 82-85, 89-90, os mesmos de rLiD1, além dos peptídeos 39, 45 e 56 (Figura 30 A e B).

Com relação à reatividade destes anticorpos anti- rLiD1 frente à Loctox i5 (Kalapothakis, Chatzaki *et al.*, 2007), os primeiros peptídeos não se mostraram reativos. No entanto, os peptídeos 19, 83 e 87-89 mostraram-se reativos e também os peptídeos 42, 50, 62, 69 e 70 (Figura 31 A e B).

A proteína Loctox i7 (Kalapothakis, Chatzaki *et al.*, 2007) teve como peptídeos mais reativos os peptídeos 20, 82 e 85, que são os peptídeos comuns com as outras proteínas, e também os peptídeos 39, 45, 55, 57, 64, 69 e 76, como mostram a Figura 32 A e B .

Nas Figuras 33 A e B, podemos ver destacados os peptídeos mais reativos de LiRecDT5 (Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2007), além dos peptídeos comuns, os peptídeos 20 e 84, apresentam também os peptídeos 16, 28, 36, 39, 49, 56, 63-66, 70, 74 e 80.

Em relação a LiRecDT4 (Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2007), os peptídeos N-terminal foram reativos (2, 5-8) e também os peptídeos comuns encontrados nas outras proteínas (20, 83-84), além dos peptídeos, 35, 39, 45, 47, 70 e 89 (Figura 34).

(A)

1	ADKRRPIWIMGHMVN	46	DLNHYP LIKGFKDQL
2	RRPIWIMGHMVNAIA	47	HYPLIKGFKDQLTQD
3	IWIMGHMVNAIAQID	48	LIKGFKDQLTQDGHP
4	MGHVMNAIAQIDFV	49	GFKDQLTQDGHPPELM
5	MVNAIAQIDFVNLG	50	DQLTQDGHPPELMDKV
6	AIAQIDFVNLGANS	51	TQDGHPPELMDKVGHD
7	QIDFVNLGANSIET	52	GHPPELMDKVGHDVSG
8	EFVNLGANSIETDVS	53	ELMDKVGHDVSGNDA
9	NLGANSIETDVSFDD	54	DKVGHDFSGNDAIGD
10	ANSIETDVSFDDNAN	55	GHDFSGNDAIGDVGN
11	IETDVSFDDNANPEY	56	FSGNDAIGDVGNAYK
12	DVSFDDNANPEYTYH	57	NDAIGDVGNAYKKAG
13	FDDNANPEYTYHGIP	58	IGDVGNAYKKAGISG
14	NANPEYTYHGIPCDC	59	VGNAVKKAGISGHVW
15	PEYTYHGIPCDCGRS	60	AYKKAGISGHVWQSD
16	TYHGIPCDCGRSCLK	61	KAGISGHVWQSDGIT
17	GIPCDCGRSCLKWEN	62	ISGHVWQSDGITNCL
18	CDCGRSCLKWENFND	63	HVWQSDGITNCLLRG
19	GRSCLKWENFNDFLK	64	QSDGITNCLLRGLDR
20	CLKWENFNDFLKGLR	65	GITNCLLRGLDRVKQ
21	WENFNDFLKGLRSAT	66	NCLLRGLDRVKQAIA
22	FNDFLKGLRSATTPG	67	LRGLDRVKQAIANRD
23	FLKGLRSATTPGNAK	68	LDRVKQAIANRDSAN
24	GLRSATTPGNAKYQA	69	VKQAIANRDSANGFI
25	SATTPGNAKYQAKLI	70	AIANRDSANGFINKV
26	TPGNAKYQAKLILVV	71	NRDSANGFINKVYYW
27	NAKYQAKLILVFDL	72	SANGFINKVYYWTVD
28	YQAKLILVFDLKTG	73	GFINKVYYWTVDKRA
29	KLILVFDLKTGSLY	74	NKVYYWTVDKRATTR
30	LVVFDLKTGSLYDNQ	75	YYWTVDKRATTRDAL
31	FDLKTGSLYDNQANE	76	TVDKRATTRDALDAG
32	KTGSLYDNQANEAGK	77	KRATTRDALDAGVDG
33	SLYDNQANEAGKKLA	78	TTRDALDAGVDGVM
34	DNQANEAGKKLAKNL	79	DALDAGVDGVMTNYP
35	ANEAGKKLAKNLLKH	80	DAGVDGVMTNYPDVI
36	AGKKLAKNLLKHYWN	81	VDGVMTNYPDVITDV
37	KLAKNLLKHYWNNGN	82	VMTNYPDVITDVLNE
38	KNLLKHYWNNGNNGG	83	NYPDVITDVLNESAY
39	LKHYWNNGNNGGRAY	84	DVITDVLNESAYKNK
40	YWNNGNNGGRAYIVL	85	TDVLNESAYKNKFRV
41	NGNNNGRAYIVLSIP	86	LVNESAYKNKFRVAS
42	NGGRAYIVLSIPDLN	87	SAYKNKFRVASIEDN
43	RAYIVLSIPDLNHYP	88	KNKFRVASIEDNPWE
44	IVLSIPDLNHYP LIK	89	FRVASIEDNPWETF
45	SIPDLNHYP LIKGF	90	RVASIEDNPWETF

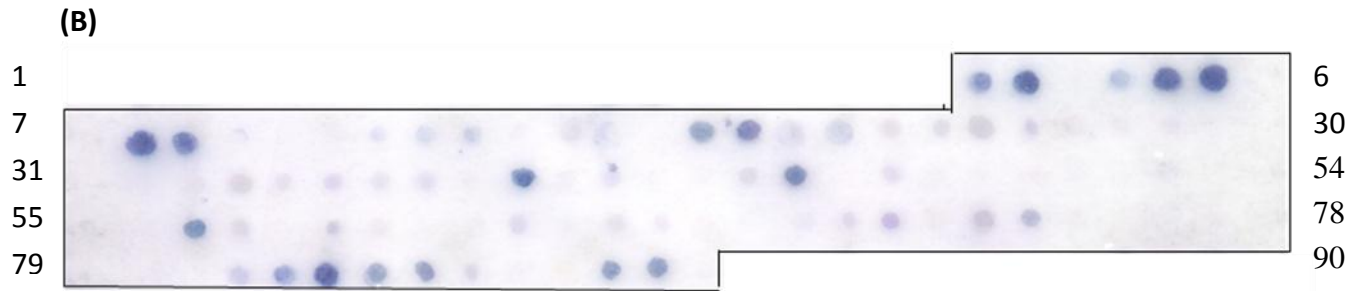


Figura 30 - Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de LiRecDT2 com o soro de coelho anti-rLiD1. (A) Seqüência de peptídeos cobrindo toda a estrutura primária do LiRecDT2. (B) A ligação de anticorpos de coelho anti-LiD1 (diluição 1:500) aos peptídeos foi detectada por um anticorpo secundário de coelho ligado a fosfatase (diluição 1:2000).

(A)		45	LSVPLLKHYELFQGF
1	EDRRPIWNMAHMVN	46	PLLKHYELFQGFRET
2	KRPIWNMAHMVNNAIS	47	KHYELFQGFRETLLKE
3	IWNMAHMVNNAISQIH	48	ELFQGFRETLLKEQGH
4	MAHMVNNAISQIHEFG	49	QGFRETLLKEQGHEEL
5	MVNNAISQIHEFGALG	50	RETLKEQGHEELLEK
6	AIHQIHEFGALGANS	51	LKEQGHEELLEKVGY
7	QIHEFGALGANSIET	52	QGHEELLEKVGYDFS
8	EFGALGANSIETDVS	53	EELLEKVGYDFSGND
9	ALGANSIETDVSFDK	54	LEKVGYDFSGNDDIS
10	ANSIETDVSFDKNAK	55	VGYDFSGNDDISDIE
11	IETDVSFDKNAKPEY	56	DFSGNDDISDIEEAY
12	DVSFKNNAKPEYTFH	57	GNDDISDIEEAYRLA
13	FDKNAKPEYTFHGIP	58	DISDIEEAYRLAGIS
14	NAKPEYTFHGIPCDC	59	DIEEAYRLAGISEHI
15	PEYTFHGIPCDCFRN	60	EAYRLAGISEHIWQS
16	TFHGIPCDCFRNCMN	61	RLAGISEHIWQSDGI
17	GIPCDCFRNCMNWEY	62	GISEHIWQSDGITNC
18	CDCFRNCMNWEYFNH	63	EHIWQSDGITNCIYR
19	FRNCMNWEYFNHFLE	64	WQSDGITNCIYRQGF
20	CMNWEYFNHFLEGLR	65	DGITNCIYRQGFDRVI
21	WEYFNHFLEGLRNAT	66	TNCIYRQGFDRVIQAV
22	FNHFLEGLRNATTPG	67	IYRQGFDRVIQAVNAR
23	FLEGLRNATTPGNPK	68	GFDRVIQAVNAREKF
24	GLRNATTPGNPKYRD	69	RVIQAVNAREKFEGI
25	NATTPGNPKYRDRMI	70	QAVNAREKFEGIIKK
26	TPGNPKYRDRMILVV	71	NAREKFEGIIKKVYF
27	NPKYRDRMILVVFDL	72	EKFEGIIKKVYFWTA
28	YRDRMILVVFDLKSN	73	EGIIKKVYFWTADKP
29	RMILVVFDLKSNGLY	74	IKKVYFWTADKPSTV
30	LVVFDLKSNGLYYDA	75	VYFWTADKPSTVKLA
31	FDLKSNGLYYDAQAR	76	WTADKPSTVKLALGE
32	KSNGLYYDAQARDAG	77	DKPSTVKLALGESVD
33	GLYYDAQARDAGKNL	78	STVKLALGESVDGIM
34	YDAQARDAGKNLALS	79	KLALGESVDGIMTNY
35	QARDAGKNLALSLLQ	80	LGESVDGIMTNYPNV
36	DAGKNLALSLLQNYW	81	SVDGIMTNYPNVVVD
37	KNLALSLLQNYWNNG	82	GIMTNYPNVVVDVLK
38	ALSLLQNYWNNGDNG	83	TNYPNVVVDVLKIDE
39	LLQNYWNNGDNGGRA	84	PNVVVDVLKIDEYQQ
40	NYWNNGDNGGRAYIV	85	VVDVLKIDEYQQRFR
41	NNGDNGGRAYIVLSV	86	VLKIDEYQQRFRFAT
42	DNGGRAYIVLSVPLL	87	IDYQQRFRFRFATIDD
43	GRAYIVLSVPLLKHY	88	YQQRFRFRFATIDDPW
44	YIVLSVPLLKHYELF	89	RRFRFRFATIDDPWEKY

(B)

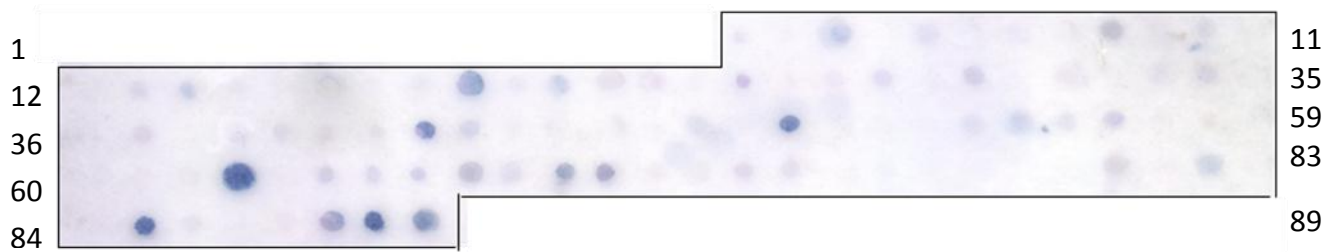


Figura 31 - Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de Loxtox i5 com o soro de coelho anti-rLiD1. (A) Seqüência de peptídeos cobrindo toda a estrutura primária do Loxtox i5. (B) A ligação de anticorpos de coelho anti-LiD1 (diluição 1:500) aos peptídeos foi detectada por um anticorpo secundário de coelho ligado a fosfatase (diluição 1:2000).

(A)	1	ADSRKPIWDIAHMVN	45	SLETITRPNFISGFR
	2	RKPIWDIAHMVNDLG	46	TITRPNFISGFRDAI
	3	IWDIAHMVNDLGLVD	47	RPNFISGFRDAIKAS
	4	IAHMVNDLGLVDEYL	48	FISGFRDAIKASGHE
	5	MVNDLGLVDEYLGDG	49	GFRDAIKASGHEELF
	6	DLGLVDEYLGDGANG	50	DAIKASGHEELFEKI
	7	LVDEYLGDGANGLEL	51	KASGHEELFEKIGWD
	8	EYLGDGANGLELDVA	52	GHEELFEKIGWDFSG
	9	GDGANGLELDVAFTA	53	ELFEKIGWDFSGNED
	10	ANGLELDVAFTADGT	54	EKIGWDFSGNEDLGE
	11	LELDVAFTADGTADK	55	GWDFSGNEDLGEIRR
	12	DVAFTADGTADKMYH	56	FSGNEDLGEIRRVYQ
	13	FTADGTADKMYHGVP	57	NEDLGEIRRVYQKYG
	14	DGTADKMYHGVPDCD	58	LGEIRRVYQKYGIED
	15	ADKMYHGVPDCDFRS	59	IRRVYQKYGIEDHIW
	16	MYHGVPDCDFRSCTR	60	VYQKYGIEDHIWQGD
	17	GVPCDFRSCTRTEG	61	KYGIEDHIWQGDGIT
	18	CDCFRSCTRTEGFTK	62	IEDHIWQGDGITNCL
	19	FRSCTRTEGFTKYMD	63	HIWQGDGITNCLPRG
	20	CTRTEGFTKYMDYIR	64	QGDGITNCLPRGDYR
	21	TEGFTKYMDYIRQLT	65	GITNCLPRGDYRLTE
	22	FTKYMDYIRQLTTPG	66	NCLPRGDYRLTEAMK
	23	YMDYIRQLTTPGNSK	67	PRGDYRLTEAMKKKN
	24	YIRQLTTPGNSKFKS	68	DYRLTEAMKKKNDPN
	25	QLTTPGNSKFKSQLI	69	LTEAMKKKNDPNYKY
	26	TPGNSKFKSQLILLI	70	AMKKKNDPNYKYTLK
	27	NSKFKSQLILLIMDL	71	KKNDPNYKYTLKVYT
	28	FKSQLILLIMDLKLN	72	DPNYKYTLKVYTWISI
	29	QLILLIMDLKLNIE	73	YKYTLKVYTWISIDKE
	30	LLIMDLKLNIEPNV	74	TLKVYTWISIDKESSI
	31	MDLKLNGIEPNVAYA	75	VYTWISIDKESSIRNA
	32	KLNGIEPNVAYAAGK	76	WSIDKESSIRNALRL
	33	GIEPNVAYAAGKSVA	77	DKESSIRNALRLGVD
	34	PNVAYAAGKSVAEKL	78	SSIRNALRLGVDAM
	35	AYAAGKSVAEKLLSG	79	RNALRLGVDAMTNY
	36	AGKSVAEKLLSGYWQ	80	LRLGVDAMTNYPAR
	37	SVAEKLLSGYWQNGK	81	GVDAMTNYPARVKS
	38	EKLLSGYWQNGKSGA	82	AVMTNYPARVKSILR
	39	LSGYWQNGKSGARAY	83	TNYPARVKSILRESE
	40	YWQNGKSGARAYIVL	84	PARVKSILRESEFSG
	41	NGKSGARAYIVLSLE	85	VKSILRESEFSGTHR
	42	SGARAYIVLSLETIT	86	ILRESEFSGTHRMAT
	43	RAYIVLSLETITRPN	87	ESEFSGTHRMATYDD
	44	IVLSLETITRPNFIS	88	FSGTHRMATYDDNPW
			89	GTHRMATYDDNPWQK

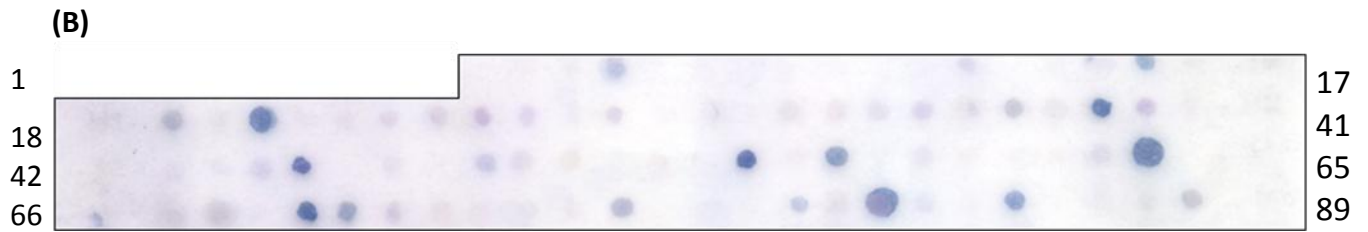


Figura 32 - Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de Loxtox i7 com o soro de coelho anti-rLiD1. (A) Seqüência de peptídeos cobrindo toda a estrutura primária do Loxtox i7. (B) A ligação de anticorpos de coelho anti-LiD1 (diluição 1:500) aos peptídeos foi detectada por um anticorpo secundário de coelho ligado a fosfatase (diluição 1:2000).

(A)	1	ADNRRPIWNIAHMVN	45	SIPTITRVTFVNGFY
	2	RRPIWNIAHMOVNDKG	46	TITRVTFVNGFYDKL
	3	IWNIAHMOVNDKGLID	47	RVTVFVNGFYDKLHSE
	4	IAHMOVNDKGLIDEYL	48	FVNGFYDKLHSEGFD
	5	MVNDKGLIDEYLLDDG	49	GFYDKLHSEGFQYR
	6	DKGLIDEYLLDDGANS	50	DKLHSEGFQYREKV
	7	LIDEYLLDDGANSVES	51	HSEGFQYREKVGVD
	8	EYLLDDGANSVESDVS	52	GFDQYREKVGVDVFSG
	9	DDGANSVESDVSFDS	53	QYREKVGVDVFSGNED
	10	ANSVESDVSFDSNGK	54	EKVGVDVFSGNEDLED
	11	VESDVSFDSNGKPEK	55	GVDFSGNEDLEDTGK
	12	DVSFDSNGKPEKMLH	56	FSGNEDLEDTGKILK
	13	FDSNGKPEKMLHGSP	57	NEDLEDTGKILKSRD
	14	NGKPEKMLHGSPCDC	58	LEDTGKILKSRDILD
	15	PEKMLHGSPCDCGRS	59	TGKILKSRDILDHIW
	16	MLHGSPCDCGRSCKR	60	ILKSRDILDHIWQSD
	17	GSPCDCGRSCKRQMS	61	SRDILDHIWQSDGIT
	18	CDCGRSCKRQMSFAD	62	ILDHIWQSDGITNCL
	19	GRSCKRQMSFADYLD	63	HIWQSDGITNCLFRI
	20	CKRQMSFADYLDYMR	64	QSDGITNCLFRIMKR
	21	QMSFADYLDYMRQLT	65	GITNCLFRIMKRLKA
	22	FADYLDYMRQLTTPG	66	NCLFRIMKRLKAAIR
	23	YLDYMRQLTTPGDPK	67	FRIMKRLKAAIRKRD
	24	YMRQLTTPGDPKFRE	68	MKRLKAAIRKRDSNG
	25	QLTTPGDPKFRENLI	69	LKAAIRKRDSNGYMV
	26	TPGDPKFRENLILVM	70	AIRKRDSNGYMKVY
	27	DPKFRENLILVMLDL	71	KRDSNGYMKVYTWS
	28	FRENLILVMLDLKLK	72	SNGYMKVYTWSVDK
	29	NLILVMLDLKLLKLS	73	YMKVYTWSVDKYTT
	30	LVMLDLKLLKLSSEQ	74	KVYTWSVDKYTTMRK
	31	LDLKLKLLKLSSEQAYS	75	TWSVDKYTTMRKALR
	32	KLKLLKLSSEQAYSAGQ	76	VDKYTTMRKALRAGA
	33	KLSSEQAYSAGQEVA	77	YTTMRKALRAGADGM
	34	SEQAYSAGQEVASQM	78	MRKALRAGADGMITN
	35	AYSAGQEVASQMLDK	79	ALRAGADGMITNFPK
	36	AGQEVASQMLDKYWK	80	AGADGMITNFPKRLV
	37	EVASQMLDKYWKRG	81	DGMITNFPKRLVSVL
	38	SQMLDKYWKRGESGA	82	ITNFPKRLVSVLNER
	39	LDKYWKRGESGARAY	83	FPKRLVSVLNEREF
	40	YWKRGESGARAYIVL	84	RLVSVLNEREFSGKF
	41	RGESGARAYIVLSIP	85	SVLNEREFSGKFRLA
	42	SGARAYIVLSIPTIT	86	NEREFSGKFRLATYN
	43	RAYIVLSIPTITRV	87	EFSGKFRLATYNDNP
	44	IVLSIPTITRVTFVN	88	GKFRLATYNDNPWER
			89	RLATYNDNPWERYTG

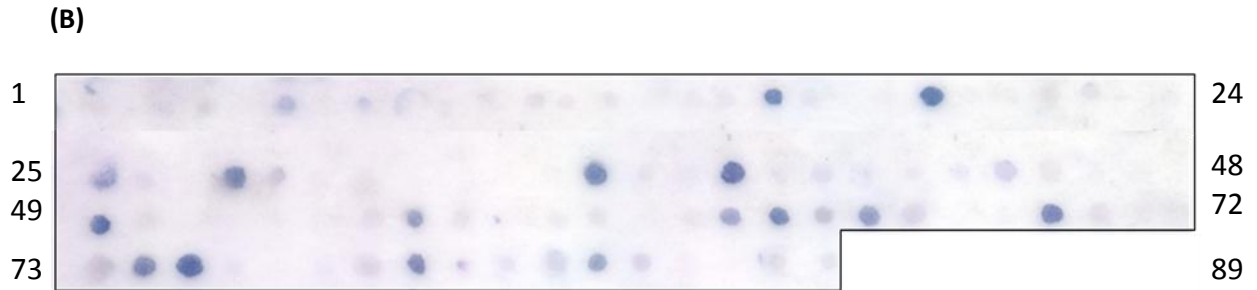


Figura 33 - Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de LiRecDT5 com o soro de coelho anti-rLiD1. (A) Sequência de peptídeos cobrindo toda a estrutura primária do LiRecDT5. (B) A ligação de anticorpos de coelho anti-LiD1 (diluição 1:500) aos peptídeos foi detectada por um anticorpo secundário de coelho ligado a fosfatase (diluição 1:2000).

(A)		45	SIPNLNHYDLIKGFR
1	ADGRRPIWNMGHVMV	46	NLNHYDLIKGFRETI
2	RRPIWNMGHVMNGIW	47	HYDLIKGFRETITTK
3	IWNMGHVMNGIWQID	48	LIKGFRETITKKGHP
4	MGHVMNGIWQIDQFV	49	GFRETITKKGHPELM
5	MVNGIWQIDQFVDLG	50	ETITKKGHPELMEKV
6	GIWQIDQFVDLGVNS	51	TKKGHPPELMEKVGVD
7	QIDQFVDLGVNSIEF	52	GHPPELMEKVGVDYDFA
8	QFVDLGVNSIEFDIN	53	ELMEKVGVDYDFAANDN
9	DLGVNSIEFDINFDK	54	EKVGVDYDFAANDNIPD
10	VNSIEFDINFDKNGK	55	GYDFAANDNIPDVEK
11	IEFDINFDKNGKPVY	56	FAANDNIPDVEKAYG
12	DINFDKNGKPVYTYH	57	NDNIPDVEKAYGKVG
13	FDKNGKPVYTYHGVP	58	IPDVEKAYGKVGVD
14	NGKPVYTYHGVPDCD	59	VEKAYGKVGVDTHVW
15	PVYTYHGVPDCDFRS	60	AYGKVGVDTHVWQSD
16	TYHGVPDCDFRSCLN	61	KVGVDTHVWQSDGIT
17	GVPCDFRSCLNWEY	62	VDTHVWQSDGITNCI
18	CDCFRSCLNWEYFGE	63	HVWQSDGITNCIARG
19	FRSCLNWEYFGEFLT	64	QSDGITNCIARGLSR
20	CLNWEYFGEFLTALR	65	GITNCIARGLSRVKE
21	WEYFGEFLTALRHRT	66	NCIARGLSRVKEAVK
22	FGEFLTALRHRTTPG	67	ARGLSRVKEAVKERD
23	FLTALRHRTTPGDKL	68	LSRVKEAVKERDSSG
24	ALRHRTTPGDKLYKE	69	VKEAVKERDSSGVIN
25	HRTTPGDKLYKEKLI	70	AVKERDSSGVINKVY
26	TPGDKLYKEKLILFV	71	ERDSSGVINKVYIWT
27	DKLYKEKLILFVFDM	72	SSGVINKVYIWTIDK
28	YKEKLILFVFDMKTN	73	VINKVYIWTIDKFS
29	KLILFVFDMKTNLSY	74	KVYIWTIDKFSSTRD
30	LFVFDMKTNLSYDNQ	75	IWTIDKFSSTRDALD
31	FDMKTNLSYDNQAYQ	76	IDKFSSTRDALDAGV
32	KTNSLYDNQAYQAGV	77	FSSTRDALDAGVDGI
33	SLYDNQAYQAGVNMA	78	TRDALDAGVDGIMTN
34	DNQAYQAGVNMATDI	79	ALDAGVDGIMTNPYP
35	AYQAGVNMATDIFKY	80	AGVDGIMTNPYPVLN
36	AGVNMATDIFKYYWN	81	DGIMTNPYPVLNDVL
37	NMATDIFKYYWNNQ	82	MTNPYPVLNDVLKEG
38	TDIFKYYWNNQNGG	83	YPYVLNDVLKEGAYK
39	FKYYWNNQNGGRAY	84	VLNDVLKEGAYKNKF
40	YWNNQNGGRAYFIL	85	DVLKEGAYKNKFRMA
41	NGQNGGRAYFILSIP	86	KEGAYKNKFRMATYE
42	NGGRAYFILSIPNLN	87	AYKNKFRMATYEDNP
43	RAYFILSIPNLNHYD	88	NKFRMATYEDNPWVT
44	FILSIPNLNHYDLIK	89	FRMATYEDNPWVTFK

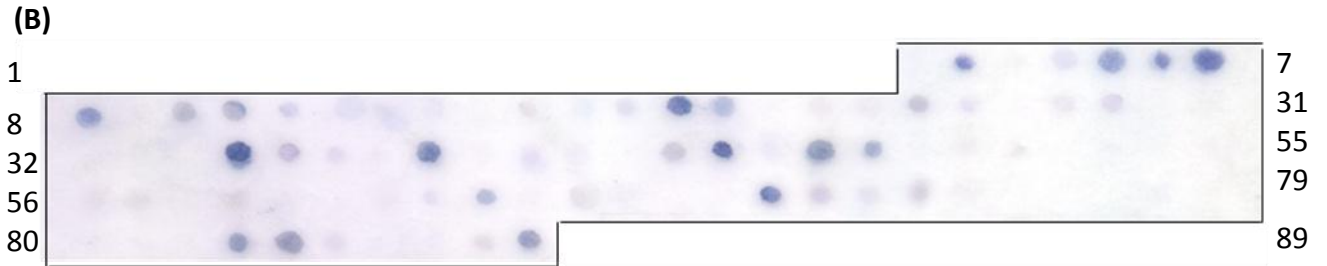


Figura 34 - Reatividade de peptídeos de 15 aminoácidos derivados da estrutura primária de LiRecDT4 com o soro de coelho anti-rLiD1. (A) Sequência de peptídeos cobrindo toda a estrutura primária do LiRecDT4. (B) A ligação de anticorpos de coelho anti-LiD1 (diluição 1:500) aos peptídeos foi detectada por um anticorpo secundário de coelho ligado a fosfatase (diluição 1:2000).

A figura 35, mostrando o alinhamento de todas essas proteínas mapeadas, mostra dois epitopos comuns entre elas. O epitopo correspondente ao peptídeo 20, incluindo os aminoácidos de número 58 a 69. E também o epitopo correspondente aos peptídeos 83-84, resíduos número 249-267 foi reconhecido pelo soro anti-rLiD1 em todas as proteínas.

Curiosamente, os primeiros peptídeos (1-8), resíduos de 1 a 35, foram fortemente reconhecidos nas proteínas que apresentam maior atividade biológica (LiRecDT2, rLiD1 e LiRecDT4), enquanto que as proteínas que apresentam pouco ou nenhuma atividade dermonecrótica, não tiveram sua região N-terminal reconhecida pelo anticorpo anti-rLiD1.

Resultados

	5	15	25	35	45
LiRecDT2	ADKRRPIWIM	GHMVNAIAQI	DEFVNLGANS	IETDVS	FDDN ANPEYTYHGI
Loxtox i5	EDRKRPIWNM	AHMVNAISQI	HEFGALGANS	IETDVS	FDDN AKPEYTFHGI
Loxtox i7	ADSRKPIWDI	AHMVNDLGLV	DEYLDGANG	LELDVAFTAD	GTADKMYHGV
LiRecDT5	ADNRRPIWNI	AHMVNDKGLI	DEYLDDGANS	VESDVS	FDSN GKPEKMLHGS
LiRecDT4	ADGRRPIWNM	GHMVNGIWQI	DQFVDLGVNS	IEFDIN	FDDN GKPVYTYHGV
rLiD1	AGNRRPIWIM	GHMVNAIGQI	DEFVNLGANS	IETDVS	FDDN ANPEYTYHGI
Consenso	PIW	HMVN	G N	E D F	HG

	55	65	75	85	95
LiRecDT2	PCDCGRSCLK	WENFNDFLKG	LRSATTPGNA	KYQAKLILVV	FDLKTGSLY-
Loxtox i5	PCDCFRNCMN	WEYFNHFLEG	LRNATTPGNP	KYRDRMILVV	FDLKSNGLYY
Loxtox i7	PCDCFRSCTR	TEGFTKYMDY	IRQLTTPGNS	KFKSQLILLI	MDLKLNGIE-
LiRecDT5	PCDCGRSCKR	QMSFADYLDY	MRQLTTPGDP	KFRENLILVM	LDLKLKLS-
LiRecDT4	PCDCFRSCLN	WEYFGEFLTA	LRHRTTPGDK	LYKEKLILFV	FDMKTNSLY-
rLiD1	PCDCGRNCKK	YENFNDFLKG	LRSATTPGNS	KYQEKLVLVV	FDLKTGSLY-
Consenso	PCDC R C	F	R TTPG	L	D K

	105	115	125	135	145
LiRecDT2	DNQANEAGKK	LAKNLLKHYW	NNGNNGGRAY	IVLSIPDLNH	YPLIKGFKDQ
Loxtox i5	DAQARDAGKN	LALSLLOQYW	NNGDNGGRAY	IVLSVPLLKH	YELFQGFRET
Loxtox i7	PNVAYAAGKS	VAEKLLSGYW	QNGKSGARAY	IVLSLETITR	PNFISGFRDA
LiRecDT5	SEQAYSAGQE	VASQMLDKYW	KRGESGARAY	IVLSIPTITR	VTFVNGFYDK
LiRecDT4	DNQAYQAGVN	MATDIFKYW	NNGQNGGRAY	FILSIPNLNH	YDLIKGFRET
rLiD1	DNQANDAGKK	LAKNLLQHYW	NNGNNGGRAY	IVLSIPDLNH	YPLIKGFKDQ
Consenso	A AG	A YW	G G RAY	LS	GF

	155	165	175	185	195
LiRecDT2	LTQDGHPELM	DKVGHDFSGN	DAIGDVGNAV	KKAGISGHVW	QSDGITNCLL
Loxtox i5	LKEQGHEELL	EKVGYDFSGN	DDISDIEEAY	RLAGISEHIW	QSDGITNCIY
Loxtox i7	IKASGHEELF	EKIGWDFSGN	EDLGEIRRVY	QKYGIEDHIW	QGDGITNCLP
LiRecDT5	LHSEGFQYR	EKVGVD	FSGN EDLEDTGKIL	KSRDILDHIW	QSDGITNCLF
LiRecDT4	ITKKGHPELM	EKVGYDFSAN	DNIPDVEKAY	GKVGVTDHVW	QSDGITNCIA
rLiD1	LTKDGHPELM	DKVGHDFSGN	DDISDVGKAY	KKAGITGHIW	QSDGITNCLP
Consenso	G	K G DFS N		H W Q	DGITNC

	205	215	225	235	245
LiRecDT2	RGLDRVKQAI	ANRD-SANGF	INKVYYWTV	KRATTRDALD	AGVDGVMTNY
Loxtox i5	RGFDRVIQAV	NARE-KFEGI	IKKVYFWTAD	KPSTVKLALG	ESVDGIMTNY
Loxtox i7	RGDYRLTEAM	KKKNDPNYKY	TLKVYTWSID	KESSIRNALR	LGVDVMTNY
LiRecDT5	RIMKRLKAAI	RKRD--SNGY	MVKVYTWSD	KYTTMRKALR	AGADGMITNF
LiRecDT4	RGLSRVKEAV	KERD-SG-GV	INKVYIWTID	KFSSTRDALD	AGVDGIMTNY
rLiD1	RGLSRVNAAV	ANRD-SANGF	INKVYYWTV	KRSTTRDALD	AGVDGIMTNY
Consenso	R R A		KVY W D K	AL	D TN

	255	265	275	285
LiRecDT2	PDVITDVLNE	SAYKNKFRVA	SYEDNPWETF	KK---
Loxtox i5	PNVVVDVLKI	DEYQQRFRFA	TIDDPWEKY	KPYGK
Loxtox i7	PARVKSILRE	SEFSGTHRMA	TYDDNPWQK-	-----
LiRecDT5	PKRLVSVLNE	REFSGKFLA	TYNDNPWERY	TG---
LiRecDT4	PYVLNDVLKE	GAYKNKFRMA	TYEDNPWVTF	KA---
rLiD1	PDVITDVLNE	AAYKKKFRVA	TYDDNPWVTF	KK---
Consenso	P L	R A	DNPW	

Figura 35 - Alinhamento das 6 proteínas de *L. intermedia* estudadas. As histidinas do sítio ativo estão marcadas em vermelho e os aminoácidos envolvidos na estabilização nas pontes de hidrogênio e na estabilidade da coordenação do Mg^{+2} estão marcados em verde. Todos estes resíduos apresentam-se conservados em todas as proteínas estudadas. Os epitopos de todas as proteínas localizados com o soro anti-rLiD1 de coelho estão representados em amarelo.

4.15 IMUNOREATIVIDADE DE SMASE I

Ao testarmos o soro anti-rLiD1 de coelho frente a peptídeos de 25 aminoácidos cobrindo a estrutura primária de Smase I de *L. laeta*, encontramos muitas semelhanças em relação à imunoreatividade de rLiD1. O soro anti-rLiD1 reconheceu os peptídeos 1-8 em Smasel (Figura 36 A e B), equivalentes aos peptídeos 1-8 em LiD1 (Figura 29 A e B), reconheceu os peptídeos 20-22 em rLiD1 correspondentes aos peptídeos 23-27 em Smasel, os peptídeos 66-67 em rLiD1 correspondentes ao peptídeo 104 de Smase I, os peptídeos 82-84 de rLiD1 correspondentes aos peptídeos 121-125 de Smase I. Todos os peptídeos reconhecidos na seqüência de rLiD1 com o anticorpo de cavalo foram também reconhecidos em Smase I pelo soro anti-rLiD1.

A figura 37 mostra o alinhamento estrutural de rLiD1 e Smasel, destacados em retângulos coloridos, estão os epitopos de rLiD1 reconhecidos pelo soro de cavalo anti- *L. intermedia*.

Os peptídeos 1 e 6 são os mais acessíveis, 11 de 15 resíduos são acessíveis (74 %), os peptídeos 3 e 5 apresentam 10 resíduos acessíveis (67 %) , o peptídeo 2 apresenta 7 resíduos acessíveis (47 %) e o peptídeo 4, apresenta 8 resíduos acessíveis (53 %).

Como característica destes epitopos, foi notável a presença de resíduos aparentemente importantes à formação do complexo antígeno-anticorpo. Nestas regiões imunorreativas há aminoácidos característicos em comum, como, por exemplo, asparagina (N) ou com perfis aromáticos como fenilalanina (F) e tirosina (Y) ou ácidas como ácido aspártico (D).

(A)

1 ADNRRPIWNLAHMVNAVAQIPDFLD
 2 NRRPIWNLAHMVNAVAQIPDFLDLG
 3 RPIWNLAHMVNAVAQIPDFLDLGN
 4 IWNLAHMVNAVAQIPDFLDLGNAL
 5 NLAHMVNAVAQIPDFLDLGNALEA
 6 AHMVNAVAQIPDFLDLGNALEADV
 7 MVNAVAQIPDFLDLGNALEADVTF
 8 NAVAQIPDFLDLGNALEADVTFKG
 9 VAQIPDFLDLGNALEADVTFKGSV
 10 QIPDFLDLGNALEADVTFKGSVPT
 11 PDFLDLGNALEADVTFKGSVPTYT
 12 FLDLGNALEADVTFKGSVPTYTYH
 13 DLGNALEADVTFKGSVPTYTYHGT
 14 GANALEADVTFKGSVPTYTYHGTPC
 15 NALEADVTFKGSVPTYTYHGTPCDF
 16 LEADVTFKGSVPTYTYHGTPCDFGR
 17 ADVTFKGSVPTYTYHGTPCDFGRDC
 18 VTFKGSVPTYTYHGTPCDFGRDCIR
 19 FKGSVPTYTYHGTPCDFGRDCIRWE
 20 GSVPTYTYHGTPCDFGRDCIRWEYF
 21 VPTYTYHGTPCDFGRDCIRWEYFNV
 22 TYTYHGTPCDFGRDCIRWEYFNVFL
 23 TYHGTPCDFGRDCIRWEYFNVFLKT
 24 HGTPCDFGRDCIRWEYFNVFLKTLR
 25 TPCDFGRDCIRWEYFNVFLKTLREY
 26 CDFGRDCIRWEYFNVFLKTLREYTT
 27 FGRDCIRWEYFNVFLKTLREYTTPG
 28 RDCIRWEYFNVFLKTLREYTTPGNA
 29 CIRWEYFNVFLKTLREYTTPGNAHY
 30 RWEYFNVFLKTLREYTTPGNAHYRD
 31 EYFNVFLKTLREYTTPGNAHYRDGF
 32 FNVFLKTLREYTTPGNAHYRDGFIL
 33 VFLKTLREYTTPGNAHYRDGFILFV
 34 LKTLREYTTPGNAHYRDGFILFVLD
 35 TLREYTTPGNAHYRDGFILFVLDLK
 36 REYTTPGNAHYRDGFILFVLDLKTG
 37 YTTPGNAHYRDGFILFVLDLKTGSL
 38 TPGNAHYRDGFILFVLDLKTGSLSN
 39 GNAHYRDGFILFVLDLKTGSLSDQ
 40 AHYRDGFILFVLDLKTGSLSDQVR
 41 YRDGFILFVLDLKTGSLSDQVRPA
 42 DGFILFVLDLKTGSLSDQVRPAGE
 43 FILFVLDLKTGSLSDQVRPAGEKV
 44 LFVLDLKTGSLSDQVRPAGEKVAK
 45 VLDLKTGSLSDQVRPAGEKVAKEL
 46 DLKTGSLSDQVRPAGEKVAKELLQ
 47 KTGSLSDQVRPAGEKVAKELLQNY
 48 GSLSNDQVRPAGEKVAKELLQNYWN
 49 LSNDQVRPAGEKVAKELLQNYWNG
 50 NDQVRPAGEKVAKELLQNYWNGNN

51 QVRPAGEKVAKELLQNYWNGNNGG
 52 RPAGEKVAKELLQNYWNGNNGGRA
 53 AGEKVAKELLQNYWNGNNGGRAYV
 54 EKVAKELLQNYWNGNNGGRAYVVL
 55 VAKELLQNYWNGNNGGRAYVVLSL
 56 KELLQNYWNGNNGGRAYVVLSPD
 57 LLQNYWNGNNGGRAYVVLSPDIG
 58 QNYWNGNNGGRAYVVLSPDIGHY
 59 YWNGNNGGRAYVVLSPDIGHYEF
 60 NNGNNGGRAYVVLSPDIGHYEFVR
 61 GNNGGRAYVVLSPDIGHYEFVRGF
 62 NNGRAYVVLSPDIGHYEFVRGFKE
 63 GRAYVVLSPDIGHYEFVRGFKEVL
 64 AYVVLSPDIGHYEFVRGFKEVLKK
 65 VVLSPDIGHYEFVRGFKEVLKKEG
 66 LSLPDIGHYEFVRGFKEVLKKEGHE
 67 LPDIGHYEFVRGFKEVLKKEGHEPD
 68 DIGHYEFVRGFKEVLKKEGHEPDL
 69 GHYEFVRGFKEVLKKEGHEPDLLEK
 70 YEFVRGFKEVLKKEGHEPDLLEKVG
 71 FVRGFKEVLKKEGHEPDLLEKVGYD
 72 RGFKEVLKKEGHEPDLLEKVGYDFS
 73 FKEVLKKEGHEPDLLEKVGYDFSGP
 74 EVLKKEGHEPDLLEKVGYDFSGPYL
 75 LKKEGHEPDLLEKVGYDFSGPYLPS
 76 KEGHEPDLLEKVGYDFSGPYLPSLP
 77 GHEPDLLEKVGYDFSGPYLPSLPTL
 78 EPDLLEKVGYDFSGPYLPSLPTLDA
 79 DLLEKVGYDFSGPYLPSLPTLDATH
 80 LEKVGYDFSGPYLPSLPTLDATHEA
 81 KVGYDFSGPYLPSLPTLDATHEAYK
 82 GYDFSGPYLPSLPTLDATHEAYKKA
 83 DFSGPYLPSLPTLDATHEAYKKA
 84 SGPYLPSLPTLDATHEAYKKA
 85 PYLPSLPTLDATHEAYKKA
 86 LP
 87 SL
 88 PT
 89 LD
 90 AT
 91 HE
 92 AY
 93 KK
 94 AG
 95 VD
 96 GH
 97 IW
 98 LS
 99 DG
 100 LT

101	NFSPLGDMARLKEAIKSRDSANGFI	117	VDKVSTTKAALDVGVDGIMTNPV
102	SPLGDMARLKEAIKSRDSANGFINK	118	KVSTTKAALDVGVDGIMTNPVLT
103	LGDMARLKEAIKSRDSANGFINKIY	119	STTKAALDVGVDGIMTNPVLTGV
104	DMARLKEAIKSRDSANGFINKIYYW	120	TKAALDVGVDGIMTNPVLTGVLK
105	ARLKEAIKSRDSANGFINKIYYWSV	121	AALDVGVDGIMTNPVLTGVLKES
106	LKEAIKSRDSANGFINKIYYWSVDK	122	LDVGVDGIMTNPVLTGVLKESGY
107	EAIKSRDSANGFINKIYYWSVDKVS	123	VGVDGIMTNPVLTGVLKESGYND
108	IKSRDSANGFINKIYYWSVDKVSTT	124	VDGIMTNPVLTGVLKESGYNDKY
109	SRDSANGFINKIYYWSVDKVSTTKA	125	GIMTNPVLTGVLKESGYNDKYRL
110	DASNGFINKIYYWSVDKVSTTKAAL	126	MTNYPNVLTGVLKESGYNDKYRLAT
111	SNGFINKIYYWSVDKVSTTKAALDV	127	NYPNVLTGVLKESGYNDKYRLATYD
112	GFINKIYYWSVDKVSTTKAALDVG	128	PNVLTGVLKESGYNDKYRLATYDDN
113	INKIYYWSVDKVSTTKAALDVGVDG	129	VLTKESGYNDKYRLATYDDNPW
114	KIYYWSVDKVSTTKAALDVGVDGIM	130	TGVLKESGYNDKYRLATYDDNPWET
115	YYWSVDKVSTTKAALDVGVDGIMTN	131	VLKESGYNDKYRLATYDDNPWETF
116	WSVDKVSTTKAALDVGVDGIMTNP	132	KESGYNDKYRLATYDDNPWETFKN

(B)

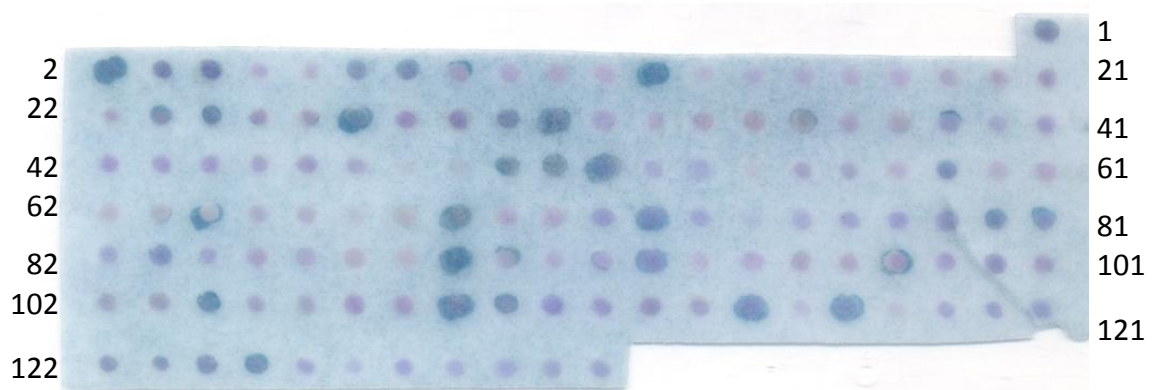


Figura 36 - Reatividade de peptídeos de 25 aminoácidos derivados da estrutura primária de SMASE 1 com o soro de coelho anti-rLiD 1.

(A) Seqüência de 25 aminoácidos cobrindo toda a seqüência de SMASE 1. Peptídeos foram sintetizados pelo método de SPOT síntese. Os peptídeos mais reativos estão marcados em amarelo. Algumas das regiões consenso estão marcadas em vermelho. (B) Reatividade dos 132 peptídeos derivados da seqüência de SMASE 1 frente ao soro de coelho anti-rLiD1.



Figura 37 - Alinhamento estrutural de LiD1 e SMASE1 de *L. laeta*. A estrutura de SMase 1 (PDB: 1XX1) (Murakami *et al.*, 2005) e o modelo de LiD1 foram submetidos ao algoritmo JOY (Mizuguchi *et al.*, 1998). Em caixas pretas podemos observar os resíduos do sitio ativo (Murakami *et al.*, 2005). Em letra minúscula podemos observar os aminoácidos acessíveis ao solvente, em negrito e sublinhado podemos observar os resíduos responsáveis pela formação de ponte dissulfeto. Em vermelho, resíduos presentes em alfa-hélice e em azul, resíduos presentes em fita beta. Em retângulos coloridos, estão destacados os epitopos de rLiD1 reconhecidos pelo soro de cavalo identificados na figura 21, destacados com a mesma cor.

4.16 ESTUDO DE EPITOPOS DESCONTÍNUOS

Com o objetivo de identificar os epitopos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal neutralizante do veneno da aranha *L. intermedia* (Limab7), os peptídeos de 15 aminoácidos (Figura 21 A) correspondentes à seqüência da proteína LiD1 (Kalapothakis *et al.*, 2002) foram testados, no entanto, não houve reatividade dos spots (Figura 38).

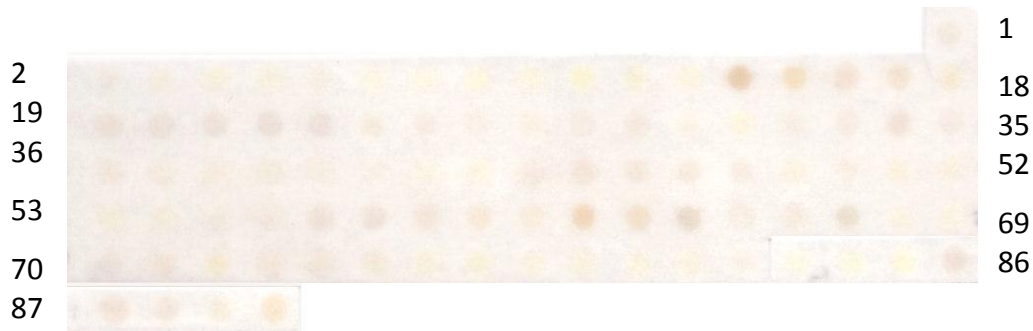


Figura 38 - Reatividade da seqüência linear da LiD1 frente ao anticorpo monoclonal 7 anti *L. intermedia* (Limab7). A membrana foi ensaiada com 10 µg/ml de LimAb7

Como não houve reatividade do LimAb 7 com peptídeos lineares correspondentes à seqüência da proteína LiD1, especulou-se a possibilidade de seu epitopo ser descontínuo.

Com o objetivo de localizar epitopos descontínuos de rLiD1, utilizamos a ferramenta computacional PEPOP (Moreau *et al.*, 2008).

Através desta análise computacional, 4 grupos principais de segmentos acessíveis foram preditos (Tabela 6). E, a partir de dois métodos de predição de epitopos descontínuos - NN (nearest neighbor) e ONN (optimized nearest neighbor) – 35 peptídeos diferentes foram preditos (Figura 39 A).

A esses peptídeos, foi adicionada uma cisteína N-terminal e C-terminal. Após ciclização das mesmas, a reatividade deles foi testada em spot. Nenhum dos peptídeos, porém, foi reativo com 10 µg/ml de Limab7 (não mostrado). Entretanto, quando o soro de coelho anti-rLiD1 foi utilizado, percebemos uma maior reatividade dos peptídeos 30 e 31, destacados no retângulo (Figura 39 B). Outros peptídeos, destacados em cinza na figura 39 A, também reagiram, mas mais fracamente.

Tabela 6 - Segmentos acessíveis de rLiD1 e sua posição na seqüência.

GRUPO	SEGMENTO	SEQUENCIA	TAMANHO	POSIÇÃO NA SEQUENCIA
1	Segmento 38	H	1	187 to 187
	Segmento 39	Q	1	190 to 190
	Segmento 40	ITNCLPRGLSR	11	194 to 204
	Segmento 41	NA	2	206 to 207
	Segmento 42	AN	2	210 to 211
	Segmento 43	DSAN	4	213 to 216
	Segmento 44	F	1	218 to 218
	Segmento 55	TYDDN	5	269 to 273
	Segmento 56	V	1	276 to 276
	Segmento 57	FKK	3	278 to 280
2	Segmento 1	AGNR	4	1 to 4
	Segmento 14	PGNSKYQEK	9	77 to 85
	Segmento 3	DE	2	21 to 22
	Segmento 4	NLG	3	25 to 27
	Segmento 45	YWT	3	224 to 226
	Segmento 46	DKRST	5	228 to 232
	Segmento 47	RD	2	234 to 235
	Segmento 48	DA	2	238 to 239
	Segmento 49	Y	1	248 to 248
	Segmento 50	D	1	250 to 250
	Segmento 51	TD	2	253 to 254
	Segmento 52	NEAA	4	257 to 260
	Segmento 53	KKK	3	262 to 264
	Segmento 54	RV	2	266 to 267
3	Segmento 24	PD	2	135 to 136
	Segmento 25	N	1	138 to 138
	Segmento 26	Y	1	140 to 140
	Segmento 27	K	1	144 to 144
	Segmento 28	KD	2	147 to 148
	Segmento 29	TKDG	4	151 to 154
	Segmento 30	PE	2	156 to 157
	Segmento 31	MDK	3	159 to 161
	Segmento 32	GN	2	168 to 169
	Segmento 33	DISD	4	171 to 174
	Segmento 34	K	1	177 to 177
	Segmento 35	KK	2	180 to 181
	Segmento 36	G	1	183 to 183
Segmento 37	T	1	185 to 185	

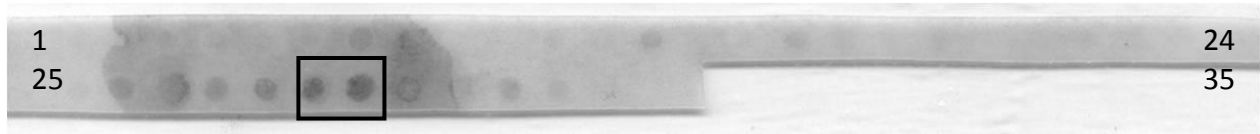
Resultados

4	Segmento 10	KKYEN	5	59 to 63
	Segmento 11	ND	2	65 to 66
	Segmento 12	K	1	69 to 69
	Segmento 13	R	1	72 to 72
	Segmento 15	K	1	94 to 94
	Segmento 16	GS	2	96 to 97
	Segmento 17	YDNQ	4	99 to 102
	Segmento 18	ND	2	104 to 105
	Segmento 19	KK	2	108 to 109
	Segmento 2	IG	2	17 to 18
	Segmento 20	KN	2	112 to 113
	Segmento 21	QH	2	116 to 117
	Segmento 22	NNGNN	5	120 to 124
	Segmento 23	R	1	127 to 127
	Segmento 5	DD	2	38 to 39
	Segmento 6	N	1	42 to 42
	Segmento 7	EY	2	44 to 45
	Segmento 8	YH	2	47 to 48
	Segmento 9	IPCDCGRN	8	50 to 57

(A)

1 ITNCLPRGLSRNAAN
2 TYDDNVFKKDSANFH
3 HVFKKDSANFQ
4 FKKDSANFHVTYDDN
5 PGNSKYQEKNLGD TD
6 RVT DNEAAKKKRDDA
7 YWTDKRSTRDDARVTD
8 AGNRRVTDNEAAKKK
9 PGNSKYQEKNLGD TD
10 KKKRVTDNEAARDDA
11 YWTDKRSTRDDARVTD
12 DISDKKKGTPEMDK
13 NDISDKKKGT
14 KKDTKDGPEMDK
15 NYKKDTKDGPE
16 PDGNDISDKKKG
17 DISDKKKGTMDK
18 KDTKDGPEMDK
19 PDGNDISDKKK
20 DISDKKKGTMDKPETKDG
21 TGKKKDISDNYKKDTKDG
22 MDKPETKDGKDKYNPD
23 NYKKDTKDGPEMDKT
24 KKGTKDISDNYKKDTKDG
25 TKDGPEMDKKDKYNPD
26 PEMDKKDTKDGKYNPD
27 PDGNDISDKKKGTMDK
28 IPCDCGRNKKYENND
29 QHNNGNRRKND
30 KGSYDNQNDKKKNQH
31 YDNQNDKKKNQH
32 KKYENNDKRRNNGNRR
33 KKYENNDKRRNNGNN
34 YDNQNDKKKNQHKRR
35 KRRNNGNNQHNDIGKKYEN

(B)



(C)

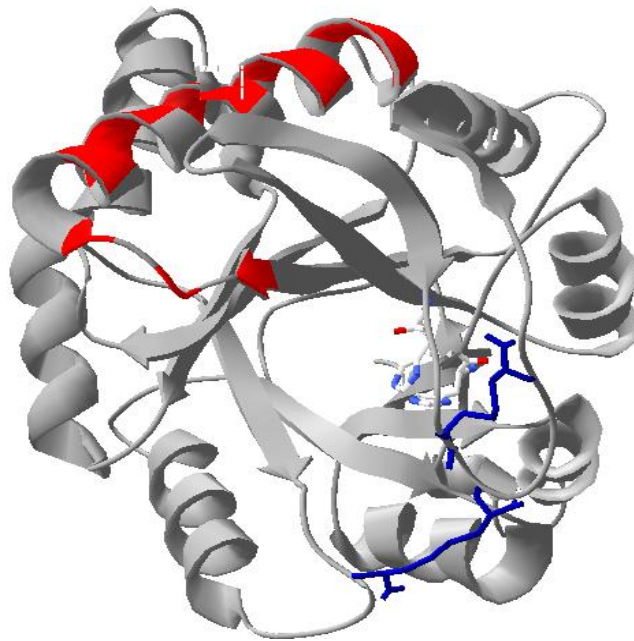


Figura 39 - Peptídeos preditos por PEPPOP e sua reatividade frente ao anti-rLiD1. Os trinta e cinco peptídeos de rLiD1 preditos por PEPPOP (A) foram ensaiados com anti-rLiD1 de coelho na diluição de 1:500 (B). O peptídeo descontínuo-contínuo localizado faz parte de uma α -hélice e esta destacado em vermelho no modelo tridimensional de LiD1 (C). Na figura estão representadas também as histidinas do sitio ativo e as pontes dissulfeto da proteína em azul.

Os peptídeos 30 (KGSYDNQNDKKNQH) e 31 (YDNQNDKKNQH) foram ambos preditos pelo método ONN. O peptídeo 30 engloba o peptídeo 31 e é composto dos segmentos 15 a 21. Alguns dos aminoácidos deste epitopo (resíduos 94, 96,97, 99, 102, 104, 105, 108, 109, 112, 113, 116, 117), são os mesmos do peptídeo 4, tabela 4, já encontrados no mapeamento linear de rLiD1 (resíduos 100-114).

Como o epitopo de LiD1 reconhecido pelo Limab7 não foi determinado, um estudo de phage display, foi conduzido em nosso laboratório pela doutoranda Juliana de Moura (Moura, 2005) com o objetivo de localizar peptídeos que se ligam ao Limab 7. Durante seu trabalho, 15 peptídeos foram seqüenciados, resultando em 4 diferentes seqüências. Através da comparação das seqüências encontradas por *phage display* com a seqüência de rLiD1, nenhuma similaridade de seqüência foi observada.

Devido a isso, empregamos nesse trabalho uma metodologia computacional capaz de localizar esses peptídeos que mimetizam o epitopo do Limab7, chamados de mimotopos, na localização destes aminoácidos na estrutura tridimensional de rLiD1. Para tal, os peptídeos obtidos por *phage display* (mimotopos), a seqüência e o modelo da estrutura tridimensional de rLiD1, foram analisados pelo programa MIMOP (Moreau, Granier *et al.*, 2006). Através de 2 análises, uma de alinhamento entre os mimotopos e a seqüência de rLiD1 (MimAlign) e outra da busca de um consenso entre as seqüências de mimotopos entre si e sua busca na estrutura de rLiD1, 9 aminoácidos foram preditos como o epitopo do Limab7 (Figura 40). Estes aminoácidos incluem: C197, Y224, W225, T226, D228, K229, R230, T232 e Y248.

Essa predição parece ser plausível, já que dois dos aminoácidos preditos (W225 e D228) fazem parte do sitio ativo das esfingomielinases D, o que poderia explicar a capacidade neutralizante destes anticorpos.

De todos esses aminoácidos encontrados, o aminoácido Y248, faz parte do epitopo linear encontrado em todas as proteínas mapeadas de *L. intermedia* (peptídeo 82-83).

	Mimotopos
1	QDEERVSSCPKVAWTFC
2	NCNKNDHLFACW
3	ECTQKYDWLFCM
4	ECKSDWMPPYCP

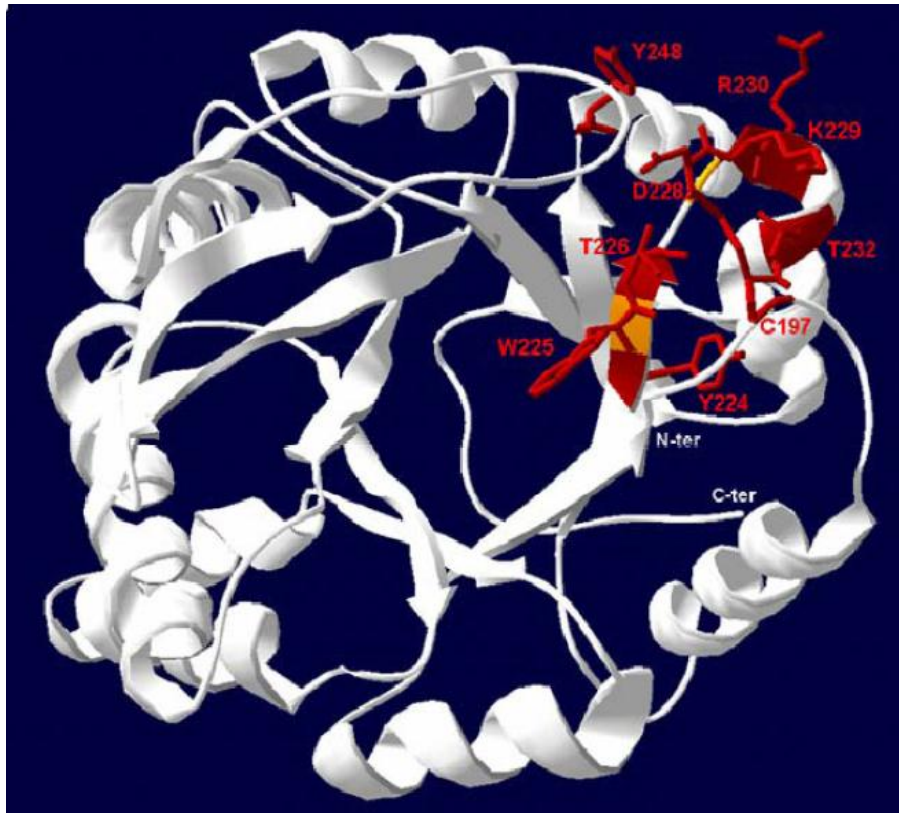


Figura 40 - Mimotopos de rLiD1 identificados por MIMOP . Os mimotopos selecionados por phage display (mimotopos de 1 a 4) foram localizados no modelo tridimensional de rLiD1.

Após esses trabalhos, com o intuito de se confirmar os resultados experimentais e a predição de MIMOP, iniciamos um estudo de mutagênese sítio dirigida em rLiD1.

Para isso, análises foram realizadas com o intuito de escolhermos os aminoácidos a serem mutados. Os dois aminoácidos do sítio ativo, são aminoácidos chave e muito conservados entre as seqüências de *L. intermedia* e *L. laeta*. Se mutarmos esses aminoácidos, a estrutura tridimensional de rLiD1 poderá ser alterada.

Se tivermos a estrutura desta proteína alterada, será impossível interpretarmos os resultados. A C197 está envolvida na formação de uma ponte de dissulfeto e por isso também não será escolhida para os estudos de mutagênese. Em SMase I de *L. laeta*, essa cisteína corresponde a uma fenilalanina que estabelece uma interação hidrofóbica com outra fenilalanina. Nas duas moléculas portanto, o aminoácido na posição 197 estabelece uma interação forte com seu aminoácido parceiro. É possível que a mutação de um desses aminoácidos implicará na mutação de seu parceiro para que a interação continue. Isto significa que essa interação é essencial. Será portanto, imprudente mutar a C197, o que poderia levar a um desarranjo na molécula.

Entre os aminoácidos restantes, Y224, T226, K229, R230, T232 e Y248, uma análise de conservação em relação à Smase I e de acessibilidade destes aminoácidos foi realizada.

Como mostrado na tabela 7, as treoninas 226 e 232 mostraram baixos valores de acessibilidade. Escolhemos, portanto, os outros 4 aminoácidos para a realização dos estudos de mutagênese sítio dirigida (Y224, K229, R230 e Y248).

Como controle, escolhemos dois outros aminoácidos que não apresentam características essenciais para a integridade de LiD1, situados do lado oposto a esses aminoácidos na estrutura tridimensional de LiD1, são eles a K91 e a N124.

Cada um desses aminoácidos será mutado pelo aminoácido alanina.

Tabela 7 – Acessibilidade dos aminoácidos de rLiD1 preditos por MIMOP comparados aos de Smase I

LiD1	DSSP	Smase	DSSP
C	80	F	84
Y	53	Y	68
W	28	W	31
T	30	S	38
D	36	D	38
K	132	K	128
R	149	V	63
T	27	T	51
Y	96	Y	77

Os aminoácidos de *L. Laeta* comparados aos aminoácidos preditos por MIMOP, mostrando os valores relativos de acessibilidade analisados através do programa DSSP.

Para tal experimento, a técnica de PCR foi escolhida. Para tal, diferentes iniciadores foram construídos em diferentes regiões da molécula, como descrito na figura 7 de material e métodos. Esta figura mostra também a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos de LiD1 e as regiões que serão mutadas. A tabela 2 mostra todos os iniciadores construídos para este estudo de mutagênese sitio dirigida.

Cada fragmento foi então amplificado separadamente, como mostram as figuras 41 A e 41 B e depois estes fragmentos foram submetidos a uma PCR com os iniciadores LiD1F e LiD1R, para união dos fragmentos (Figura 41C).

Estes fragmentos foram purificados e cortados com a enzima de restrição BamH1. Atualmente, estamos realizando os experimentos de clonagem.

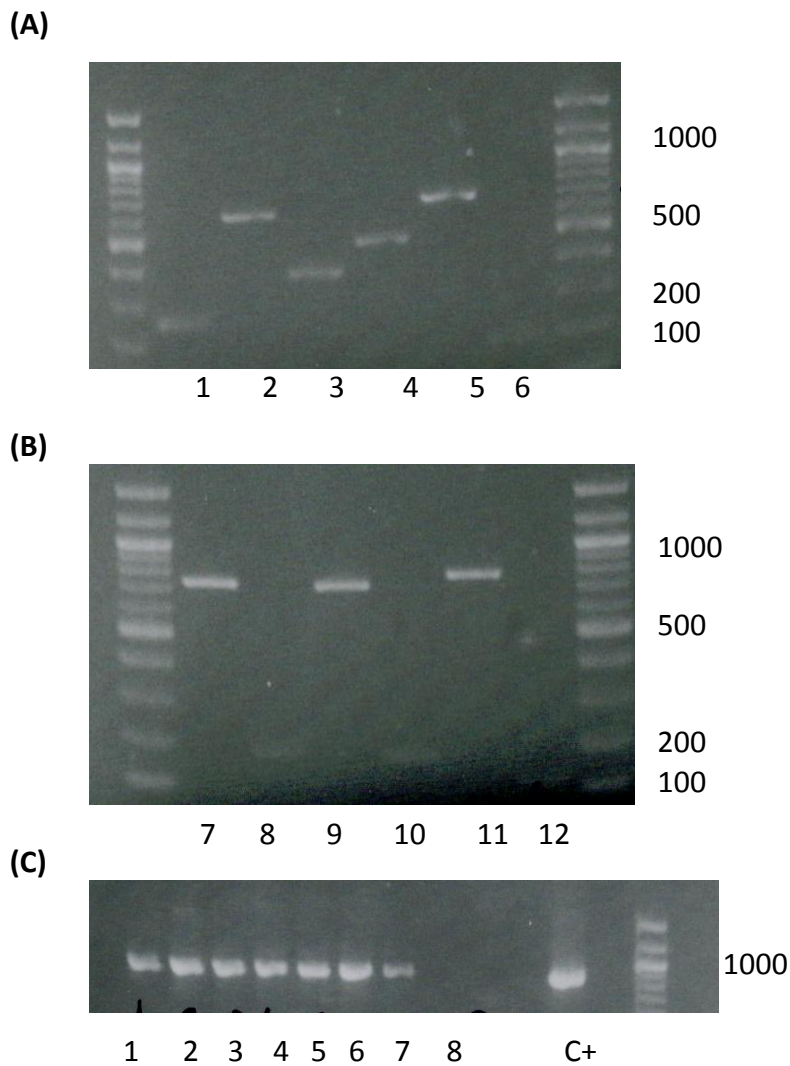


Figura 41 – Gel de Agarose dos fragmentos amplificados por PCR.

Canaleta 1, indica o fragmento 1, obtido pela PCR utilizando os iniciadores (LiD1F e K91A R), canaleta 2, o fragmento obtido utilizando K81A F e LiD1R; 3, o fragmento obtido pelos iniciadores LiD1 F e N124A R ; a 4, pelos iniciadores N124A F e LiD1 R ; a 5, pelos iniciadores LiD1 F e Y224A R e a 6, pelos iniciadores Y224A F e LiD1 R. (B) Na canaleta 7, observamos o fragmento obtido pela PCR com os iniciadores LiD1 F e K229A R; na 8, com os iniciadores K229A F e LiD1 R, na 9, LiD1 F e R230A R , na 10, com os R230A F e LiD1 R, na 11, com os LiD1F e Y248A R e na 12, com os Y248A F e LiD1R. (C) Os iniciadores LiD1 F e LiD1 R foram utilizados para amplificar os fragmentos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 9 e 10, 11 e 12 provenientes da PCR acima. Obtivemos os 6 fragmentos amplificado (1-6), na canaleta 7, fizemos um controle com fragmentos sozinho (fragmento da canaleta 11) e na canaleta 8, fragmento da canaleta 12. O controle positivo foi feito com o cDNA de LiD1. Última canaleta de todos os géis: padrão de DNA em pares de bases (100 pb – New England Biolabs).

4.17 ANÁLISE DE RESÍDUOS ESTABILIZADORES DO TIM BARRIL

A fim de verificar os resíduos chave responsáveis pela estabilidade da estrutura terciária destas proteínas dermonecróticas, realizamos uma análise de alguns parâmetros de estabilidade de proteínas com enovelamento do tipo TIM-barril em SMase I (código PDB: 1XX1) como descritos por Gromiha e colaboradores (2004). Vinte e um resíduos foram encontrados através de análises de bioinformática, como mostrado na tabela 8. Para a determinação desses resíduos, parâmetros como contato de longa distância (LRO – long-range order), índice de hidrofobicidade (Hp), a presença de centros estabilizadores (SC) e também a conservação de resíduos de aminoácidos.

Tabela 8 – Resíduos estabilizadores da estrutura de TIM-barril de SMASE I

	Residuo	Conservação	Hp	LRO	SC
1	LEU10	7	20.90	0.03860	1
2	ASN29	9	24.48	0.03860	1
3	ALA30	6	25.80	0.03158	1
4	LEU31	7	23.84	0.03158	1
5	ASP34	9	20.03	0.02807	1
6	THR45	8	23.56	0.02456	1
7	GLU61	7	23.14	0.02105	1
8	LEU87	9	21.17	0.02456	1
9	TYR128	8	20.03	0.02456	1
10	VAL129	7	20.27	0.02456	1
11	VAL130	8	24.93	0.03158	1
12	GLY162	9	29.25	0.03158	1
13	SER166	9	22.47	0.02807	1
14	TRP193	9	26.03	0.03509	1
15	LYS226	9	31.78	0.03860	1
16	TYR228	9	29.12	0.03509	1
17	TYR229	6	20.02	0.02456	1
18	ASP247	9	25.39	0.02456	1
19	GLY248	7	26.66	0.02807	1
20	ILE249	6	27.71	0.03158	1
21	THR251	9	20.72	0.02807	1

Pudemos observar que muitos desses resíduos preditos como importantes na estabilidade da estrutura terciária de SMase I, são resíduos também reconhecidos por anticorpos neutralizantes, como mostrado anteriormente neste trabalho.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O loxoscelismo é uma síndrome necrótico-hemolítica causada por acidentes com pequenos aracnídeos, popularmente chamados de aranhas marrom, pertencentes ao gênero *Loxosceles*. O envenenamento pode provocar uma reação sistêmica que, quando ocorre, pode causar falha renal e, conseqüentemente, ser letal (Futrell, 1992).

No Brasil, o estado do Paraná é o responsável pelo maior número de casos de acidentes. A vigilância dos acidentes loxoscélicos neste Estado teve seu início em 1993, quando foi instituída a Comissão Interinstitucional envolvendo a Universidade Federal do Paraná e as Secretarias Municipal e Estadual de Saúde. Desde então, os episódios vêm se apresentando a cada ano, mais numerosos. Esse aumento no número de caso faz com que a população em geral viva temerosa com a presença das aranhas em locais inusitados, fazendo vítimas, decorrente da proximidade destes aracnídeos com os seres humanos em suas residências (Gubert, 2005).

As principais responsáveis por estas patologias associadas ao loxoscelismo são proteínas que compõem uma fração da peçonha altamente imunogênica do veneno desses aracnídeos (Chávez-Olortegui *et al.*, 1998; Guilherme *et al.*, 2001; Alvarenga *et al.*, 2003). Esta porção protéica localiza-se, em SDS-PAGE, próximo ao padrão de massa molecular de 32 kDa para *L. laeta* e de 35 kDa para as espécies *L. intermedia* e *L. gaucho* (Barbaro, Cardoso *et al.*, 1992b). Estas proteínas, descritas como dermonecróticas ou esfingomielinases, são também associadas aos efeitos locais e sistêmicos observados nas vítimas de aranhas marrom (Hogan, Barbaro *et al.*, 2004).

Com o objetivo de desenvolver antivenenos específicos e também fornecer material para pesquisa de como este grupo de proteínas agem nos tecidos biológicos, nosso grupo vem trabalhando no isolamento e caracterização dos cDNAs codificadores destas toxinas objetivando a produção dessas proteínas recombinantes (Kalapothakis *et al.*, 2007).

Em 2002, nosso grupo clonou e expressou uma proteína recombinante de *Loxosceles intermedia* em fusão com a β -galactosidase (Kalapothakis *et al.*, 2002). Porém, essa proteína não apresentou atividade biológica. Neste trabalho de tese, essa proteína recombinante (rLiD1) clonada no vetor pET11a foi expressa em forma solúvel usando cepas de bactéria BL21, de uma maneira similar à expressão de SMAse1 de *L. laeta* (Fernandes Pedrosa Mde, Junqueira De Azevedo Ide *et al.*, 2002). rLiD1 foi purificada em apenas um passo, por

cromatografia em fase reversa utilizando-se uma coluna semi-preparativa C8, rendendo-nos cerca de 25.8 mg/L de proteína.

Para avaliar as propriedades biológicas de rLiD1, quatro ensaios biológicos diferentes foram realizados comparando sua atividade biológica com a do veneno de *L. intermedia*, já que não foi possível a comparação direta com a proteína nativa, devido à dificuldade de obtenção de quantidade suficiente pura do veneno. A proteína recombinante mostrou-se funcional, como observado por sua atividade dermonecrótica em coelhos, bem como esta, foi capaz de induzir agregação de plaquetas em plasma humano. Estas atividades foram equivalentes às mesmas evocadas pelo veneno. Não sendo maior, provavelmente pelo sinergismo de diferentes proteínas encontradas nesse veneno como mostrado por Kalapothakis *et al.*, 2007.

Entretanto, em relação à atividade hemolítica, rLiD1 mostrou-se bem menos ativa quando comparada ao veneno. Esta diferença de atividade foi observada também no ensaio de atividade esfingomielinásica. Esses resultados diferem, no entanto, daqueles apresentados por Fernandes-Pedrosa (2002) e Tambourgi (2004) que mostraram alta atividade hemolítica e esfingomielinásica de suas proteínas. Por outro lado, no ensaio de atividade dermonecrótica, efeitos similares foram encontrados nas mesmas concentrações tanto por rLiD1 quanto pelo veneno, enquanto que no ensaio de atividade hemolítica, a resposta dose-efeito do veneno e da proteína não tiveram o mesmo padrão observado pelo grupo de Tambourgi. Isto pode ser devido ao fato que as várias atividades biológicas das proteínas dos venenos de *L. laeta* e *L. intermedia* não sejam apenas devido à sua atividade esfingomielinase D. Entretanto, essa hipótese, deve ser avaliada.

Várias intervenções para o tratamento do envenenamento loxoscélico já foram propostas e testadas (Pauli, Puka *et al.*, 2006). No entanto, estas pesquisas foram inconclusivas e com poucas evidências para suportar a variedade de tratamentos (Futrell, 1992); (Sams, 2001); (Wendel, 2003); (Swanson e Vetter, 2006). De todas as terapias propostas, o antiveneno vem sendo citado como o tratamento de maior potencial 'neutralizante' se administrado nas primeiras horas após o envenenamento (Rees, Shack *et al.*, 1981); (Futrell, 1992); (Gomez, Miller *et al.*, 1999); (Hogan *et al.*, 2004). A habilidade de anticorpos específicos na neutralização da atividade dermonecrótica dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* já foi bastante discutida e comprovada (Toro, Malta *et al.*, 2006); (Ramos-Cerrillo, Olvera *et al.*, 2004).

Essa produção é problemática, uma vez que apresenta grande dano ao animal produtor, que sofre os sintomas do envenenamento (Machado De Avila, Alvarenga *et al.*, 2004). Na tentativa de melhorar esse quadro, vários trabalhos vêm identificando imunógenos alternativos para a substituição do veneno total na produção do soro sem a perda da qualidade. Dentre as alternativas apresentadas estão a detoxificação do veneno pela interligação de seus componentes (Machado De Avila, Alvarenga *et al.*, 2004); (Kharrat, Zenouaki *et al.*, 1997), a produção de proteínas recombinantes atóxicas, mas indutoras de anticorpos (Araujo, Castanheira *et al.*, 2003) a encapsulação do veneno em lipossomas (Chavez-Olortegui, Amara *et al.*, 1991), o uso de peptídeos sintéticos (Alvarenga, Diniz *et al.*, 2002), (Calderon-Aranda, Olamendi-Portugal *et al.*, 1995), (Devaux, Enderlin *et al.*, 1997) , (Maria, Velarde *et al.*, 2005), (Shinnick, Sutcliffe *et al.*, 1983) e anatoxinas naturais imunogênicas, que vêm sendo identificadas no veneno de vários escorpiões (Chavez-Olortegui *et al.*, 1996); (Srairi-Abid, Mansuelle *et al.*, 2000).

Neste trabalho, primeiramente demonstramos, que nosso esquema de imunização com rLiD1 foi eficaz na indução de anticorpos protetores em camundongos desafiados com o veneno de *L. intermedia*. Setenta e cinco por cento dos camundongos imunizados sobreviveram a um desafio maior que uma DL_{100} do veneno. Esse efeito protetor foi observado 5 semanas após a última dose do imunógeno. Essa observação é consistente com existência e persistência de anticorpos neutralizantes induzidos pela proteína rLiD1. Esses resultados corroboram com resultados prévios do nosso grupo (Araujo, Castanheira *et al.*, 2003). Vale ressaltar ainda que o esquema de imunização foi conduzido na ausência de adjuvante. (Barbaro, Eickstedt *et al.*, 1994a) demonstraram o efeito adjuvante do veneno de *L. gaucho* em coelhos ao injetarem este juntamente com outros antígenos. Esse efeito adjuvante é provavelmente devido à inflamação local induzida pelo veneno. No entanto, camundongos não desenvolvem essa reação inflamatória. Seria interessante, executar o mesmo experimento na presença de adjuvantes. O papel do adjuvante é aumentar a resposta imune (Stills, 2005) e dessa forma potencializar o efeito de vacinas.

Grande parte desse trabalho esta voltada para o mapeamento de epitopos de células B, de rLiD1 e de outras proteínas de *L. intermedia*, com o objetivo de produzir peptídeos não tóxicos e imunogênicos.

Para tal, realizamos a localização dos epitopos reconhecidos pelos anticorpos protetores de camundongos anti-rLiD1, através da ligação destes à peptídeos sobrepostos

coabrindo a seqüência de aminoácidos dessa proteína. O mapeamento desses epitopos contínuos indicou que uma região N-terminal corresponde ao epitopo de rLiD1. A seqüência de aminoácidos desta região antigênica (²⁵ NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP ⁵¹) apresenta 27 resíduos com 100% de identidade com proteínas dermonecróticas de *L. similis*, *L. gaucho* (Silvestre, De Castro *et al.*, 2005) e com a proteína P2 de *L. intermedia* (Tambourgi *et al.*, 2004). 59% de identidade foi encontrado com SMAse I de *L. laeta* (Murakami *et al.*, 2005). Baseado na estrutura desta última proteína, realizamos a modelagem molecular de rLiD1, o que nos permitiu a localização desta região epitopica no modelo tridimensional. Esta região contém os resíduos E³², D³⁴ e H⁴⁸, que por homologia com SMASE I, estão envolvidos no sitio ativo de esfingomielinases enzimaticamente ativas.

Trabalhos anteriores mostraram a porção N-terminal da proteína como a mais antigênica e também altamente conservada entre as diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (Kalapothakis *et al.*, 2002); (Binford, Cordes *et al.*, 2005). Este fato pode explicar a alta reatividade cruzada (Barbaro, Eickstedt *et al.*, 1994b); (Chavez-Olortegui, Zanetti *et al.*, 1998); (Guilherme, Fernandes *et al.*, 2001) e a capacidade de antivenenos polivalentes em neutralizar a atividade dermonecrótica induzida por diferentes espécies (Barbaro, Knysak *et al.*, 2005); (Pretel, Goncalves-De-Andrade *et al.*, 2005); (Silvestre, De Castro *et al.*, 2005).

Mas, para que um dado epitopo seja interessante para a produção de imunoterápicos é necessário que ele seja não apenas antigênico, ou seja, capaz de ser reconhecido por um anticorpo previamente produzido, mas também imunogênico, capaz de provocar a produção de anticorpos específicos em um sistema biológico (Van Regenmortel, 2001).

Para avaliar a imunogenicidade deste peptídeo, este foi sintetizado de acordo com o método de Merrifield (1969), e então injetado em coelhos juntamente com adjuvante de Freund. Os dois animais imunizados tiveram uma resposta muito diferente, mas ambos foram capazes de desenvolver anticorpos que se mostraram reativos, tanto com o peptídeo sintético, quanto com a proteína (rLiD1) e também com o veneno de *L. intermedia*.

Tambourgi e colaboradores mostraram a diferença de camundongos de diferentes linhagens isogênicas em resposta ao veneno de *L. intermedia* (Tambourgi, Petricevich *et al.*, 1998). Vários fatores influenciam nessas diferenças, principalmente a natureza polimórfica

dos genes da resposta imune, que são mais polimórficos que outras famílias gênicas (Kimman, Vandebriel *et al.*, 2007).

No nosso trabalho vimos que mesmo animais da mesma raça se comportam de maneiras bem diferentes em relação a um mesmo tratamento.

Além disso, cuidados devem ser tomados na extrapolação dos resultados obtidos em coelhos para seres humanos, devido a diversas razões, entre as quais o fato da cicatrização mais rápida da lesão em coelhos que em humanos e também o fato de coelhos não desenvolverem ulcerações crônicas (Masters, 1998); (Guilherme *ET AL.*, 2001). Além disso, diferenças imunológicas e genéticas entre humanos e modelos animais têm de ser consideradas. Diferenças também nos protocolos de experimentação animal têm de serem levados em conta, como por exemplo: diferentes quantidades de veneno de diferentes espécies de *Loxosceles*; diferenças na obtenção de antivenenos e padronização de métodos, administrados por diferentes vias e com diferentes doses; e também a escolha do tipo de anticorpo (IgG inteira, fragmentos Fab ou F(ab')₂) (Pauli, Puka *et al.*, 2006).

Quando realizamos ensaios de neutralização *in vivo*, vimos que o coelho que apresentava níveis mais elevados de anticorpos foi capaz de desenvolver uma lesão necrótica muito menor – cerca de 50% - que a do animal que apresentou baixos níveis de anticorpos. Portanto, vimos que a presença de elevados níveis de anticorpos é essencial para a neutralização da atividade necrótica. O coelho que apresentou altos níveis de anticorpos foi também capaz de inibir cerca de 80% a hemorragia local, enquanto que o outro coelho não o fez. Quanto ao edema, um menor nível de proteção foi atingido, cerca de 40%.

Continuamos nosso estudo, na busca de outros peptídeos imunogênicos com o objetivo de conseguir chegar a uma mistura de peptídeos para protocolos de imunização.

Para isso, realizamos o mapeamento de epitopos de rLiD1 com um soro de cavalo anti-*L. intermedia* sabidamente neutralizante.

Localizamos 6 epitopos diferentes, dentre os quais, o epitopo 2 (peptídeos 9 -11) (Figura 21) já detectado anteriormente com o soro de camundongo (Figura 18). Curiosamente, 4 destes epitopos apresentam resíduos de tirosina – epitopos 2, 3, 4 e 6 – enquanto que os epitopos 1 e 5 apresentam resíduos de fenilalanina. E também a maior parte destes epitopos localiza-se em regiões de α - hélice. Outra peculiaridade dos epitopos encontrados é que os epitopos 1, 2, 4 e 5 apresentam características ácidas, enquanto que

os epitopos 3 e 6 apresentam características básicas (Tabela 5). E, os epitopos 3 e 6 foram encontrados também em todas as outras proteínas estudadas, e são os epitopos básicos.

Curiosamente, ainda que haja grande identidade entre as Smases dos diversos venenos loxoscélicos (Ramos-Cerrillo, Olvera *et al.*, 2004); (Binford, Cordes *et al.*, 2005); Silvestre *et al.*, 2005) há um amplo espectro de pontos isoelétricos intra e interespécies (Kurpiewski *Et al.*, 1981);(Tambourgi *et al.*, 1994); (Ramos-Cerrillo, Olvera *et al.*, 2004) o que pode vir a ser um diferencial importante nas condições ideais de atividade e de especificidade dessas enzimas, uma vez que se comprovou, por dicróismo circular, que mudanças conformacionais provocadas por mudanças de pH alteram as atividades biológicas dessas enzimas (De Andrade, Pedrosa *et al.*, 2005).

Os 6 epitopos localizados e também rLiD1 foram utilizados como imunógenos juntamente com adjuvante de Freund. Esses peptídeos de 18 aminoácidos foram utilizados sem serem acoplados a uma molécula carreadora. Em 1976, Dinitzis e colaboradores mostraram em polímeros de acrilamida, que para o desenvolvimento de uma resposta imunológica, um mínimo de 16 haptenos devem ser agrupados espacialmente. Fazendo uma analogia, utilizamos 18 aminoácidos, como se fossem 18 agrupamentos, para eliciar uma resposta imune.

No entanto, apenas um dos peptídeos, se mostrou imunogênico (Figura 24), o peptídeo 3. A razão para tal fato é desconhecida. A resposta de anticorpos à rLiD1 mostrou-se muito eficaz. Vimos também que os anticorpos anti-peptídeos foram capazes de reconhecer o antígeno como um todo (rLiD1) (Figura 22). No entanto, estes anticorpos reconheceram apenas fracamente o veneno de *L. intermedia*, o que poderia ser devido ao fato de este não ser um epitopo comum entre outras proteínas presentes no veneno de *L. intermedia*. No entanto, mostramos que este epitopo foi reconhecido em todas as proteínas estudadas (Figura 35).

A resposta aos peptídeos e à proteína recombinante se mostrou persistente, sendo possível a detecção de anticorpos circulantes específicos mesmo decorridas 8 semanas do fim da imunização (Figura 22B).

A persistência da resposta humoral específica é interessante para o possível desenvolvimento de uma vacina. A utilização de um peptídeo sintético para este fim é uma boa abordagem, uma vez que possibilita a alta especificidade, baixo risco de efeitos colaterais e a produção em larga escala (Schunk e Macallum, 2005).

Foi avaliada então a porcentagem de inibição das atividades dermonecróticas, hemorrágicas e edematogênicas provocadas pela proteína recombinante rLiD1, por anticorpos anti-rLiD1, anti-peptídeo e anti-peptídeo e proteína (co-imunizados).

Quando 300 µg de IgGs purificadas foram pré-incubadas com rLiD1, percebemos uma excelente proteção, conferida tanto pelos anticorpos anti-rLiD e co-imunizados (100%) quanto pelos anticorpos anti-peptídeos (80%) (Figura 27 A). Em relação à proteção contra as atividades hemorrágicas e edematogênicas esses níveis de proteção foram menores. Analisando esses dados podemos especular que diferentes mecanismos são responsáveis pela atividade necrótica/hemorrágica e de formação de edema.

A análise da neutralização dessas atividades *in vivo* mostrou-se um pouco diferente. Uma capacidade de neutralização menor foi encontrada em todos os grupos. Um grupo foi imunizado com o veneno de *Loxosceles intermedia*, como sendo o grupo de referência de neutralização. No entanto, nem mesmo esse grupo foi capaz de induzir 100% de neutralização da atividade necrótica, hemorrágica e edematogênica. Cerca de 80 % de proteção das atividades necróticas e hemorrágicas foram conferidos aos grupos que receberam como imunógeno, a proteína ou o veneno e também no grupo co-imunizado. O grupo imunizado com os peptídeos teve uma proteção de cerca de 50 %, enquanto que o grupo que recebeu um peptídeo não relacionado não foi protegido. Em relação à atividade edematogênica, o grupo imunizado com o veneno apresentou cerca de apenas 30 % de proteção, enquanto que os grupos imunizados com a proteína recombinante ou os co-imunizados foram protegidos em cerca de 60 %. Já os grupos imunizados com os peptídeos sintéticos quase não alteraram a formação do edema em relação ao grupo não imunizado (cerca de 10%).

Pela técnica de spot, confirmamos que os anticorpos desenvolvidos contra todos os peptídeos, tiveram uma resposta somente para um dos peptídeos. Entretanto, é razoável pensar que este não é o único epitopo neutralizante.

O anticorpo mais neutralizante (anti-rLiD1) reconheceu 3 outros epitopos além desse (Figura 29). Entretanto bons níveis de proteção foram alcançados com os anticorpos anti-peptídeo e acreditamos que melhores níveis de proteção serão alcançados com uma mistura de peptídeos imunogênicos. Para tornar esses peptídeos imunogênicos, uma alternativa é carrear-los a uma molécula maior para que assim eles possam desencadear uma resposta imunológica mais efetiva.

Epitopos localizados em rLiD1 e em outras proteínas da família das dermonecróticas foram similares aos encontrados em SMase I de *L. laeta*, sugerindo o potencial da utilização destes peptídeos sintéticos na produção de soro ou vacina.

Outra estratégia do nosso grupo foi utilizar um anticorpo monoclonal neutralizante anti-*L. intermedia* no mapeamento de epitopos de rLiD1. Entretanto, nenhum epitopo foi localizado (Figura 38). Dados da literatura indicam que a maioria dos anticorpos monoclonais reconhece epitopos descontínuos (Davies, Basham *et al.*, 1990).

Os epitopos descontínuos consistem-se de 2 ou mais regiões que se encontram separadas na seqüência linear do antígeno, mas que são aproximadas pelo enovelamento da proteína, sendo reconhecidas em conjunto pelo anticorpo. É importante ressaltar que estes epitopos descontínuos podem conter alguns pequenos segmentos contínuos (Van Regenmortel, 1996). Grande parte da resposta imune mediada por célula B produz anticorpos que reconhecem as proteínas inteiras na sua conformação nativa, uma vez que o antígeno não sofre o processamento complexo pelo qual passam os antígenos apresentados às células T. Sendo assim, os epitopos descontínuos surgem como os principais determinantes da resposta imune humoral (Janeway Ca, 2001).

O método mais informativo e acurado para a identificação de epitopos conformacionais é a determinação da estrutura tridimensional do complexo antígeno-anticorpo por cristalografia de raio-x. Entretanto, essa é uma técnica complexa e laboriosa. Além disso, a obtenção de um cristal de qualidade para este complexo é complicada pela flexibilidade inerente à ligação antígeno-anticorpo, onde ambas as moléculas sofrem as alterações conformacionais particulares no momento da interação (Colman, Laver *et al.*, 1987); (Lescar, Riottot *et al.*, 1993).

Apesar da predominância desse tipo de epitopo, são poucas as outras técnicas desenvolvidas para a identificação precisa e conseqüentemente os trabalhos considerando esse tipo de abordagem são menos numerosos. Dentre essas poucas técnicas existentes, a maioria se baseia em abordagens computacionais, sendo as técnicas realmente experimentais ainda mais escassas (Haste Andersen P, 2006); (Rapberger, Lukas *et al.*, 2007); (Van Regenmortel, 2001).

Recentemente, um método computacional baseado na análise da estrutura tridimensional do antígeno foi desenvolvido com o objetivo de realizar a predição de epitopos descontínuos (Moreau *et al.*, 2008). Esse método foi então utilizado para a

predição de epítopos descontínuos de rLiD1. Um total de 35 peptídeos foram obtidos, dos quais, nenhum apresentou reatividade com o monoclonal 7. Ao utilizarmos o soro policlonal anti-rLiD, um epítopo descontínuo foi localizado. Esse epítopo descontínuo, apresenta regiões contínuas anteriormente reconhecidas pelo anticorpo de cavalo em rLiD1.

Além desse método, pela técnica de phage display foram identificados 4 outros epítopos descontínuos. Ao compararmos a seqüência desses epítopos descontínuos com a seqüência de rLiD1, nenhuma similaridade foi encontrada. Por isso, outra ferramenta de bioinformática, MIMOP (Moreau *et al.*, 2006) foi utilizada para tal. Através desse método, localizamos uma outra região na molécula que compreendem resíduos importantes para a estabilidade do sítio ativo, além do resíduo de tirosina número 248, encontrada no peptídeo 83, localizado anteriormente em todas as proteínas dermonecróticas mapeadas com o soro anti-rLiD1. Um estudo de mutagênese sítio dirigida esta sendo realizado no intuito de confirmar esses dados obtidos por MIMOP.

Ao utilizarmos um método de predição de resíduos estabilizadores de SMasel, baseado em moléculas com o enovelamento de TIM-barril, percebemos que grande parte dos resíduos preditos como importantes na estabilização do enovelamento desta proteína, foi localizado também através da análise por mapeamento de epítopos. Por exemplo, os resíduos: 29, 30, 31, 34 encontrados em LiD1 com diferentes soros; os resíduos na região de 193, 226, 228, 229, localizados por MIMOP, além da região dos resíduos 247, 248, 249 e 251, que fazem parte do epítopo comum encontrado em todas as proteínas do veneno de *L. intermedia*.

O próximo passo deste trabalho será a síntese e imunização com esses epítopos descontínuos localizados.

O presente trabalho teve como intenção empregar uma gama de metodologias modernas e outras já consagradas, de forma a utilizar diferentes anticorpos com características neutralizantes, tanto sistêmicas (anticorpos de camundongo) quanto locais (anticorpos de coelhos, cavalo e monoclonal) na identificação de epítopos que podem vir a ter alguma utilidade biotecnológica no desenvolvimento de novas terapias, além de auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação do loxoscelismo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, obtivemos uma proteína dermonecrótica ativa (rLiD1) que utilizada como antígeno induz a formação de anticorpos neutralizantes tanto dos efeitos sistêmicos (letalidade) em camundongos, quanto dos efeitos locais em coelhos. O mapeamento de epitopos desta proteína mostrou-se um método eficaz para a determinação de peptídeos imunogênicos com grande potencial neutralizante. Resultados os quais nos encorajam na busca de uma mistura de peptídeos para sua utilização como imunógeno na produção de soro ou vacina, para uma terapia do envenenamento *Loxoscelico* em humanos.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho pretendemos:

- ✘ Carrear os peptídeos localizados pelo mapeamento de epitopo com KLH (keyhole limpet hemocyanin);
- ✘ Imunizar coelhos com os peptídeos carreados;
- ✘ Sintetizar os epitopos conformacionais, carregá-los a KLH e utilizá-los como imunógenos;
- ✘ Utilizar a mistura dos peptídeos mais eficientes em ensaios de neutralização;
- ✘ Aprimorar o método de imunização com os peptídeos a fim de uma resposta imunológica mais robusta;
- ✘ Finalizar os estudos de mutagênese sítio dirigida;
- ✘ Realizar os ensaios de imunização em cavalos para o desenvolvimento de uma soroterapia eficaz ao loxoscelismo, baseada na imunização de animais com peptídeos sintéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albericio, F. e L. A. Carpino. Coupling reagents and activation. Methods Enzymol, v.289, p.104-26. 1997.
- Alvarenga, L. M., C. R. Diniz, *et al.* Induction of neutralizing antibodies against Tityus serrulatus scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. Toxicon, v.40, n.1, Jan, p.89-95. 2002.
- Alvarenga, L. M., M. S. Martins, *et al.* Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. Toxicon, v.42, n.7, Dec, p.725-31. 2003.
- Amit, A. G., G. Boulot, *et al.* X-ray diffraction studies of an anti-azophenylarsonate antibody and of an antigen-antibody complex. Ann Inst Pasteur Immunol, v.136C, n.1, Jan-Feb, p.121-9. 1985.
- Amit, A. G., R. A. Mariuzza, *et al.* Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. Science, v.233, n.4765, Aug 15, p.747-53. 1986.
- Araujo, S. C. Clonagem, Expressão e Caracterização de toxinas das aranhas Phoneutria nigriventer e Loxosceles intermedia. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG., Belo Horizonte, 2005.
- Araujo, S. C., P. Castanheira, *et al.* Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. Toxicon, v.41, n.3, Mar 1, p.261-7. 2003.
- Atkins, J. A., C. W. Wingo, *et al.* Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest. Science, v.126, n.3263, Jul 12, p.73. 1957.
- _____. Necrotic arachnidism. Am J Trop Med Hyg, v.7, n.2, Mar, p.165-84. 1958.
- Atkins, J. A. W., C. W.; Sodeman, W. . , Washington, V., P. . . A Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest. Science, v.126, p.73. 1957.
- Ballou, L. R., S. J. Lauderkind, *et al.* Ceramide signalling and the immune response. Biochim Biophys Acta, v.1301, n.3, Jun 11, p.273-87. 1996.
- Barbaro, K. C., J. L. Cardoso, *et al.* Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. Toxicon, v.30, n.3, Mar, p.331-8. 1992a.
- _____. IgG antibodies to *Loxosceles* sp. spider venom in human envenoming. Toxicon, v.30, n.9, Sep, p.1117-21. 1992b.

- Barbaro, K. C., V. R. Eickstedt, *et al.* Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. Toxicon, v.32, n.6, Jun, p.687-93. 1994a.
- _____. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. Toxicon, v.32, n.1, Jan, p.113-20. 1994b.
- Barbaro, K. C., M. L. Ferreira, *et al.* Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. Braz J Med Biol Res, v.29, n.11, Nov, p.1491-7. 1996.
- Barbaro, K. C., I. Knysak, *et al.* Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. Toxicon, v.45, n.4, Mar 15, p.489-99. 2005.
- Barreto, O. C. O. C., J.L.; De Cillo, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, v.27, n.5, p.264-267. 1985.
- Batori, V., E. P. Friis, *et al.* An in silico method using an epitope motif database for predicting the location of antigenic determinants on proteins in a structural context. J Mol Recognit, v.19, n.1, Jan-Feb, p.21-9. 2006.
- Belshe, R. B., K. M. Edwards, *et al.* Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. N Engl J Med, v.356, n.7, Feb 15, p.685-96. 2007.
- Berger, E. A. e G. Alkhatib. HIV gp120 interactions with coreceptors: insights from studies with CCR5-based peptides. Eur J Med Res, v.12, n.9, Oct 15, p.403-7. 2007.
- Binford, G. J., M. H. Cordes, *et al.* Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. Toxicon, v.45, n.5, Apr, p.547-60. 2005.
- Binford, G. J. e M. A. Wells. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.135, n.1, May, p.25-33. 2003.
- Blythe, M. J. e D. R. Flower. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. Protein Sci, v.14, n.1, Jan, p.246-8. 2005.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Braz, A., J. Minozzo, *et al.* Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. Toxicon, v.37, n.9, Sep, p.1323-8. 1999.

- Bromley, E. H., K. Channon, *et al.* Peptide and protein building blocks for synthetic biology: from programming biomolecules to self-organized biomolecular systems. ACS Chem Biol, v.3, n.1, Jan 18, p.38-50. 2008.
- Calderon-Aranda, E. S., T. Olamendi-Portugal, *et al.* The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. Vaccine, v.13, n.13, Sep, p.1198-206. 1995.
- Calderon-Aranda, E. S., B. Selisko, *et al.* Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. Eur J Biochem, v.264, n.3, Sep, p.746-55. 1999.
- Cardoso J.L.C, F. C. D. S., Von Eikstedt V.R.D., Borges I., Nogueira M.T. Loxoscelismo. Estudo de 242 casos (1980-1984). Rev Soc Bras Toxicol, v.1, p.50-60. 1988.
- Cardoso, J. L., F. H. Wen, *et al.* Detection by enzyme immunoassay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.84, n.4, Jul-Aug, p.608-9. 1990.
- Carter, J. M. Production of anti-peptide antisera. Curr Protoc Immunol, v.Chapter 9, Aug, p.Unit 9 3. 2003.
- Castaman, G. Desmopressin for the treatment of haemophilia. Haemophilia, v.14 Suppl 1, Jan, p.15-20. 2008.
- Cen, L., W. Liu, *et al.* Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. Pediatr Res, Feb 13. 2008.
- Chaim, O. M., Y. B. Sade, *et al.* Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol, v.211, n.1, Feb 15, p.64-77. 2006.
- Chavez-Olortegui, C., D. A. Amara, *et al.* In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. Vaccine, v.9, n.12, Dec, p.907-10. 1991.
- Chavez-Olortegui, C., S. C. Fonseca, *et al.* ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, v.32, n.12, Dec, p.1649-56. 1994.
- Chavez-Olortegui, C., F. Molina, *et al.* Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. Mol Immunol, v.38, n.11, Mar, p.867-76. 2002.
- Chavez-Olortegui, C., V. C. Zanetti, *et al.* ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. Toxicon, v.36, n.4, Apr, p.563-9. 1998.

- Clerico, E. M., J. L. Maki, *et al.* Use of synthetic signal sequences to explore the protein export machinery. Biopolymers, v.90, n.3, p.307-19. 2008.
- Coddington, J. A. L. H. W. Systematics and evolution of spiders. Annu. Rev. Ecol. Syst., v.22, p.565-592. 1991.
- Coligan, J. E., J. P. Tam, *et al.* Production of antipeptide antisera. Curr Protoc Neurosci, v.Chapter 5, May, p.Unit 5 6. 2001.
- Colman, P. M., W. G. Laver, *et al.* Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. Nature, v.326, n.6111, Mar 26-Apr 1, p.358-63. 1987.
- Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res, v.16, n.22, Nov 25, p.10881-90. 1988.
- Cristina De Oliveira, K., R. M. Goncalves De Andrade, *et al.* Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. Toxicon, v.37, n.1, Jan, p.217-21. 1999.
- Da Silva, P. H., R. B. Da Silveira, *et al.* Brown spiders and loxoscelism. Toxicon, v.44, n.7, Dec 1, p.693-709. 2004.
- Da Silva, P. H., Y. Hashimoto, *et al.* Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Toxicon, v.42, n.2, Aug, p.155-61. 2003.
- Da Silveira, R. B., R. B. Pigozzo, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. Biochimie, v.88, n.9, Sep, p.1241-53. 2006.
- _____. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. Biochimie, v.89, n.3, Mar, p.289-300. 2007.
- Da Silveira, R. B., A. C. Wille, *et al.* Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Biochem J, v.406, n.2, Sep 1, p.355-63. 2007.
- Davies, C. D., T. Y. Basham, *et al.* Changes in the expression of idiotype antigen on murine B-cell lymphoma after hyperthermia alone and in combination with interferon and tumour necrosis factor. Int J Cancer, v.45, n.3, Mar 15, p.500-7. 1990.
- De Andrade, S. A., M. F. Pedrosa, *et al.* Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. Biochem Biophys Res Commun, v.327, n.1, Feb 4, p.117-23. 2005.

De Castro, C. S., F. G. Silvestre, *et al.* Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. Toxicon, v.44, n.3, Sep 1, p.273-80. 2004.

De Groot, A. S. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. Drug Discov Today, v.11, n.5-6, Mar, p.203-9. 2006.

De Oliveira, K. C., R. M. Goncalves De Andrade, *et al.* Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. Toxicon, v.45, n.4, Mar 15, p.421-9. 2005.

Desai, N., J. Sajjad, *et al.* Urotensin II: a new pharmacologic target in the treatment of cardiovascular disease. Cardiol Rev, v.16, n.3, May-Jun, p.142-53. 2008.

Devaux, B., F. Enderlin, *et al.* Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide. J Neuroimmunol, v.75, n.1-2, May, p.169-73. 1997.

Domingos, M. O., W. Tynan, *et al.* Effect of *Loxosceles gaucho* venom on cell morphology and behaviour in vitro in the presence and absence of sphingomyelin. Toxicon, v.42, n.4, Sep 15, p.439-45. 2003.

Estevao-Costa, M. I., M. S. Martins, *et al.* Neutralization of the hemorrhagic activity of Bothrops and Lachesis snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin-II. Toxicon, v.38, n.1, Jan, p.139-44. 2000.

Ey, P. L., S. J. Prowse, *et al.* Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. Immunochemistry, v.15, n.7, Jul, p.429-36. 1978.

Feitosa, L., W. Gremski, *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. Toxicon, v.36, n.7, Jul, p.1039-51. 1998.

Felicori, L., S. C. Araujo, *et al.* Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. Toxicon, v.48, n.5, Oct, p.509-19. 2006.

Felsenstein, J. Mathematics vs. Evolution: Mathematical Evolutionary Theory. Science, v.246, n.4932, Nov 17, p.941-942. 1989.

Fernandes-Pedrosa, M. F., I. L. Junqueira-De-Azevedo, *et al.* Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. BMC Genomics, v.9, n.1, Jun 12, p.279. 2008.

Fernandes Pedrosa Mde, F., L. Junqueira De Azevedo Ide, *et al.* Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. Biochem Biophys Res Commun, v.298, n.5, Nov 15, p.638-45. 2002.

Fischer, M. L. Biologia e ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae) no Município de Curitiba, PR. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 1996.

Fischer, P. M. e M. E. Howden. Synthetic peptide antigens of tetanus toxin. Mol Immunol, v.31, n.15, Oct, p.1141-8. 1994.

Foil, L. D., J. L. Frazier, *et al.* Partial characterization of lethal and neuroactive components of the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. Toxicon, v.17, n.4, p.347-54. 1979.

Forrester, L. J., J. T. Barrett, *et al.* Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. Arch Biochem Biophys, v.187, n.2, Apr 30, p.355-65. 1978.

Frank, R. Spot-synthesis: na easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron, v.48, p.9217-9232. 1992.

Fuchs, S., R. Kasher, *et al.* The binding site of acetylcholine receptor: from synthetic peptides to solution and crystal structure. Ann N Y Acad Sci, v.998, Sep, p.93-100. 2003.

Furlaneto, R. S. R. R. R. Efeito neutralizante do soro anti-loxoscélico administrado em tempos variáveis após a inoculação do veneno. Ciência e Cultura, v.14, n.4, p.253. 1962.

Futrell, J. M. Loxoscelism. Am J Med Sci, v.304, n.4, Oct, p.261-7. 1992.

Gajardo-Tobar, R. El araneismo en el mundo tropical e subtropical. Memórias do Instituto Butantan. Simpósio Internacional, v.33, n.1, p.45-54. 1966.

Galiano, M. E. Ciclo biológico y desarrollo de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Scytodidae). . Acta Zoologica Lilloana v.XXIII p.431-464. 1967.

Gatt, S., T. Dinur, *et al.* A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. Biochim Biophys Acta, v.530, n.3, Sep 28, p.503-7. 1978.

Geren, C. R., T. K. Chan, *et al.* Composition and properties of extract of fiddleback (*Loxosceles reclusa*) spider venom apparatus. Toxicon, v.11, n.6, Oct, p.471-9. 1973.

Gertsch, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). Bulletin of the American Museum of Natural History, v.136, p.117-182. 1967.

Gertsch, W. J. E., F. . The spider genus *Loxosceles* in North America , Central America and the West Indies (Araneae, Loxoscelidae). . Bulletin of the American Museum of Natural History, v.175, n.3, p.264-360. 1983.

- Geysen, H. M., T. J. Mason, *et al.* Cognitive features of continuous antigenic determinants. J Mol Recognit, v.1, n.1, Feb, p.32-41. 1988.
- Giusta, M. D. S. Identificação, síntese e caracterização antigênica de epitopos de uma das proteínas dermonecróticas da aranha *Loxosceles intermedia*. (Dissertação de Mestrado). Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG., Belo Horizonte, 2005.
- Gomez, H. F., D. M. Krywko, *et al.* A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. Ann Emerg Med, v.39, n.5, May, p.469-74. 2002.
- Gomez, H. F., M. J. Miller, *et al.* *Loxosceles* spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. Inflammation, v.23, n.3, Jun, p.207-15. 1999.
- _____. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. Toxicon, v.39, n.6, Jun, p.817-24. 2001.
- Goncalves De Andrade, R. M., K. C. De Oliveira, *et al.* Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. Toxicon, v.37, n.4, Apr, p.627-32. 1999.
- Goni, F. M. e A. Alonso. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. FEBS Lett, v.531, n.1, Oct 30, p.38-46. 2002.
- Goyffon, M. L' araném. Revue Française des Laboratoires, v.342, p.49-53. 2002.
- Grant, G. A. Synthetic peptides for production of antibodies that recognize intact proteins. Curr Protoc Immunol, v.Chapter 9, Aug, p.Unit 9 2. 2003.
- Gromiha, M. M., G. Pujadas, *et al.* Locating the stabilizing residues in (alpha/beta)₈ barrel proteins based on hydrophobicity, long-range interactions, and sequence conservation. Proteins, v.55, n.2, May 1, p.316-29. 2004.
- Gubert, I. C. Estudos epidemiológicos dos acidentes com a aranha-marrom *Loxosceles intermedia* em Curitiba, estado do Paraná, e avaliação do método de ELISA como ferramenta de diagnóstico. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em Farmacologia, Bioquímica e Molecular. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG., Belo Horizonte, 2005.
- Guex, N. e M. C. Peitsch. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis, v.18, n.15, Dec, p.2714-23. 1997.
- Guilherme, P., I. Fernandes, *et al.* Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. Toxicon, v.39, n.9, Sep, p.1333-42. 2001.

- Hannun, Y. A. e L. M. Obeid. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. Trends Biochem Sci, v.20, n.2, Feb, p.73-7. 1995.
- Haste Andersen P, N. M., Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. Protein Sci, v.15, p.2558-67. 2006.
- Hogan, C. J., K. C. Barbaro, *et al.* Loxoscelism: old obstacles, new directions. Ann Emerg Med, v.44, n.6, Dec, p.608-24. 2004.
- Isbister, G. K. Acute conjunctival inflammation following contact with squashed spider contents. Am J Ophthalmol, v.136, n.3, Sep, p.563-4. 2003.
- Isbister, G. K. e J. White. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. Toxicon, v.43, n.5, Apr, p.477-92. 2004.
- Janeway Ca, T. P., Walport M, Schlomchik M. Immunobiology. 2001
- Johnson, D., R. M. Shepherd, *et al.* Glucokinase activators: molecular tools for studying the physiology of insulin-secreting cells. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 5, Nov, p.1208-10. 2007.
- Jonassen, I., J. F. Collins, *et al.* Finding flexible patterns in unaligned protein sequences. Protein Sci, v.4, n.8, Aug, p.1587-95. 1995.
- Jones, D. H. e S. C. Winistorfer. Recombination and site-directed mutagenesis using recombination PCR. Methods Mol Biol, v.67, p.131-40. 1997.
- Jorge, M. T. V. E., V.R.D.; Knysak, I.; Fisman, L.F.Z.; Ribeiro, L.A.; . Curso sobre acidentes com animais peçonhentos. Arquivo Brasileiro de Medicina, v.65, n.5, p.457-468. 1991.
- Kabsch, W. e C. Sander. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers, v.22, n.12, Dec, p.2577-637. 1983.
- Kalapothakis, E., S. C. Araujo, *et al.* Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. Toxicon, v.40, n.12, Dec, p.1691-9. 2002.
- Kalapothakis, E., M. Chatzaki, *et al.* The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. Toxicon, v.50, n.7, Dec 1, p.938-46. 2007.
- Kessenbrock, K., R. Rajmakers, *et al.* Synthetic peptides: the future of patient management in systemic rheumatic diseases? Curr Med Chem, v.14, n.26, p.2831-8. 2007.
- Kharrat, R., I. Zenouaki, *et al.* Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. Toxicon, v.35, n.6, Jun, p.915-30. 1997.

- Kimman, T. G., R. J. Vandebriel, *et al.* Genetic variation in the response to vaccination. Community Genet, v.10, n.4, p.201-17. 2007.
- Kinyanjui, M. W. e E. D. Fixman. Cell-penetrating peptides and proteins: new inhibitors of allergic airways disease. Can J Physiol Pharmacol, v.86, n.1-2, Jan-Feb, p.1-7. 2008.
- Kniker, W. T., P. N. Morgan, *et al.* An inhibitor of complement in the venom of the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa*. Proc Soc Exp Biol Med, v.131, n.4, Sep, p.1432-4. 1969.
- Krywko, D. M. e H. F. Gomez. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: a comparison of 4 venom recovery methods. Ann Emerg Med, v.39, n.5, May, p.475-80. 2002.
- Kulkarni-Kale, U., S. Bhosle, *et al.* CEP: a conformational epitope prediction server. Nucleic Acids Res, v.33, n.Web Server issue, Jul 1, p.W168-71. 2005.
- Kurpiewski, G., B. J. Campbell, *et al.* Alternate complement pathway activation by recluse spider venom. Int J Tissue React, v.3, n.1, Mar, p.39-45. 1981.
- Kurpiewski, G., L. J. Forrester, *et al.* Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. Biochim Biophys Acta, v.678, n.3, Dec 18, p.467-76. 1981.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.
- Laune, D., F. Molina, *et al.* Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. J Immunol Methods, v.267, n.1, Sep 1, p.53-70. 2002.
- Lescar, J., M. M. Riottot, *et al.* Crystallization, preliminary X-ray diffraction study, and crystal packing of a complex between anti-hen lysozyme antibody F9.13.7 and guinea-fowl lysozyme. Proteins, v.15, n.2, Feb, p.209-12. 1993.
- Li, D., Y. Xiao, *et al.* Structure--activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers. J Biol Chem, v.279, n.36, Sep 3, p.37734-40. 2004.
- Liang, S. P., X. D. Chen, *et al.* The presynaptic activity of huwentoxin-I, a neurotoxin from the venom of the chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. Toxicon, v.38, n.9, Sep, p.1237-46. 2000.
- Lucas, S. Spiders in Brazil. Toxicon, v.26, n.9, p.759-72. 1988.
- Luciano, M. N., P. H. Da Silva, *et al.* Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. J Histochem Cytochem, v.52, n.4, Apr, p.455-67. 2004.

- Machado De Avila, R. A., L. M. Alvarenga, *et al.* Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. Toxicon, v.44, n.3, Sep 1, p.233-41. 2004.
- Machado, L. F., S. Laugesen, *et al.* Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. Proteomics, v.5, n.8, May, p.2167-76. 2005.
- Málaque, C. M. S. C.-V., J.E.; Cardoso, J.L.C.; França, F.O. S.; Barbaro, K.C.; Fan, H. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina tropical, v.44, n.3, p.139-143. 2002.
- Maretic, Z. Spider venoms and their effect. Zoological Record, v.124, n.12, p.142-159. 1987.
- Maria, W. S., D. T. Velarde, *et al.* Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. Toxicon, v.46, n.2, Aug, p.210-7. 2005.
- Marques Da Silva, E. Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1832, no período de 1993 e 2000. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências (Saúde Pública), Fundação Osvaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. . 2002.
- Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, *et al.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes. Annu Rev Biophys Biomol Struct, v.29, p.291-325. 2000.
- Martinez-Vargas, A. Z. [Loxoscelism, a health problem in Peru]. Bol Oficina Sanit Panam, v.103, n.4, Oct, p.378-86. 1987.
- Masters, E. J. Images in clinical medicine. Loxoscelism. N Engl J Med, v.339, n.6, Aug 6, p.379. 1998.
- Matyus, E., C. Kandt, *et al.* Computer simulation of antimicrobial peptides. Curr Med Chem, v.14, n.26, p.2789-98. 2007.
- Meloan, R. H., W. C. Puijk, *et al.* Mimotopes: realization of an unlikely concept. J Mol Recognit, v.13, n.6, Nov-Dec, p.352-9. 2000.
- Mendes, T. M., W. S. Maria, *et al.* Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. Toxicon, v.44, n.6, Nov, p.617-24. 2004.
- Merrifield, R. B. Solid-phase peptide synthesis. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, v.32, p.221-96. 1969.

Miller, M. J., H. F. Gomez, *et al.* Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. Am J Emerg Med, v.18, n.5, Sep, p.626-8. 2000.

Ministério Da Saúde. Secretaria Nacional De Ações Básicas De Saúde Acidentes Ofídicos. Contribuição ao estudo da morbidade. p.53. 1990.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos--Fundação Nacional de Saúde/Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. 1998.

_____. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. C. N. D. E. Fundação Nacional De Saúde, Coordenação De Vigilância Da Doenças Transmitidas Por Vetores E Antropozoonoses. . Brasília, DF: 45-56 p. 2001.

Mizuguchi, K., C. M. Deane, *et al.* HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. Protein Sci, v.7, n.11, Nov, p.2469-71. 1998.

Molina, F., D. Laune, *et al.* Improved performances of spot multiple peptide synthesis. Pept Res, v.9, n.3, May-Jun, p.151-5. 1996.

Moreau, V., C. Fleury, *et al.* PEPOP: computational design of immunogenic peptides. BMC Bioinformatics, v.9, p.71. 2008.

Moreau, V., C. Granier, *et al.* Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. Bioinformatics, v.22, n.9, May 1, p.1088-95. 2006.

Morgan, B. B., P. N. Morgan, *et al.* Lysis of human erythrocytes by venom from the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa*. Toxicon, v.16, n.1, p.85-8. 1978.

Morgenstern, B., K. Frech, *et al.* DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment. Bioinformatics, v.14, n.3, p.290-4. 1998.

Moura, J. D. Caracterização imunoquímica e Molecular da fração dermonecrotica do veneno da aranha marron *Loxosceles intermedia*. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em Farmacologia, Bioquímica e Molecular. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG., Belo Horizonte, 2005.

Moyle, P. M. e I. Toth. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. Curr Med Chem, v.15, n.5, p.506-16. 2008.

Mozes, E., U. Sela, *et al.* A novel synthetic peptide for the specific treatment of lupus: clinical effects and mechanism of action. Isr Med Assoc J, v.10, n.1, Jan, p.40-2. 2008.

Murakami, M. T., M. F. Fernandes-Pedrosa, *et al.* Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. J Biol Chem, v.280, n.14, Apr 8, p.13658-64. 2005.

Notredame, C., D. G. Higgins, *et al.* T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol, v.302, n.1, Sep 8, p.205-17. 2000.

Olvera, A., B. Ramos-Cerrillo, *et al.* North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. Toxicon, v.48, n.1, Jul, p.64-74. 2006.

Organização Pan-Americana de Saúde. 2007. www.panaftosa.org.br/

Oshima, M., P. Deitiker, *et al.* Targeting the antigen-binding site of HLA-restricting alleles in treatment of autoimmune disease. Crit Rev Immunol, v.27, n.3, p.271-88. 2007.

Ospedal, K. Z., M. H. Appel, *et al.* Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Int J Exp Pathol, v.83, n.6, Dec, p.287-94. 2002.

Ovsyannikova, I. G., K. L. Johnson, *et al.* Mass spectrometry and peptide-based vaccine development. Clin Pharmacol Ther, v.82, n.6, Dec, p.644-52. 2007.

Paixao-Cavalcante, D., C. W. Van Den Berg, *et al.* Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. J Invest Dermatol, v.126, n.1, Jan, p.61-8. 2006.

_____. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. J Invest Dermatol, v.127, n.6, Jun, p.1410-8. 2007.

Patel, K. D., V. Modur, *et al.* The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. J Clin Invest, v.94, n.2, Aug, p.631-42. 1994.

Pauli, I., J. Puka, *et al.* The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. Toxicon, v.48, n.2, Aug, p.123-37. 2006.

Peng, J. e S. P. Gygi. Proteomics: the move to mixtures. J Mass Spectrom, v.36, n.10, Oct, p.1083-91. 2001.

Pinhati H.M.S., K. A., Cardoso J.L.C., Málaque C.M.S, Fan H.M. . Reações adversas precoces ao soro anti-aracnídico em pacientes picados por *Loxosceles*, Phoneutria e escorpião. Rev Soc Bras Med Trop v.32 (suplemento 1), p.497-498. 1999.

Platnick, N. I. The world spider catalog, version 5.0. American Museum of Natural History. 2004.

- Pretel, F., R. M. Goncalves-De-Andrade, *et al.* Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. Toxicon, v.45, n.4, Mar 15, p.449-58. 2005.
- Rabilloud, T., L. Vuillard, *et al.* Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v.40, n.1, Feb, p.57-75. 1994.
- Ramos-Cerrillo, B., A. Olvera, *et al.* Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. Toxicon, v.44, n.5, Oct, p.507-14. 2004.
- Rapberger, R., A. Lukas, *et al.* Identification of discontinuous antigenic determinants on proteins based on shape complementarities. J Mol Recognit, v.20, n.2, Mar-Apr, p.113-21. 2007.
- Rees, R., R. B. Shack, *et al.* Management of the brown recluse spider bite. Plast Reconstr Surg, v.68, n.5, Nov, p.768-73. 1981.
- Rees, R. C., D.; Rieger, E.; King, L.E. The diagnosis and treatment of brown recluse spider bites. Annals of Emergency Medicine, n.16, p.945-949. 1987.
- Revillard, J. P., L. Adorini, *et al.* Apoptosis: potential for disease therapies. Immunol Today, v.19, n.7, Jul, p.291-3. 1998.
- Ribeiro, L. A. E., V.R.D.; Rubio, G.B.G.; Konolsaisen, J.F.; Handar, Z.; Entres, M.; Campos, V.A.F.P.; Jorge, M.T. . Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* Heinecken ; Lowe no Estado do Paraná (Brasil). Memórias do Instituto Butantan, v.55, n.1, p.19-26. 1993.
- Romani, L., T. Zelante, *et al.* IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. J Immunol, v.180, n.8, Apr 15, p.5157-62. 2008.
- Rosenfeld, G., Nahas, L., Cillo, D.M. And Fleury, C.T. Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões. Atualização terapêutica, p.931-944. 1957.
- Ruppert, E. E. B., R.D. Zoologia dos Invertebrados. 1996.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989
- Sams, H. H., C. A. Dunnick, *et al.* Necrotic arachnidism. J Am Acad Dermatol, v.44, n.4, Apr, p.561-73; quiz 573-6. 2001.
- Sandidge, J. S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. Nature, v.426, n.6962, Nov 6, p.30. 2003.
- Santos, V. L. P. F., C.R.C.; Viggiano, R.L.L.; Silveira, R.B.; Cantão, M.P.; Mangili, O.C. Veiga, S.S.; Gremski, W. Structural and ultra structural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). . Toxicon, v.38, p.265-285. 2000.

Secretaria Municipal de Saúde. Protocolo Técnico Acidentes loxoscélicos. Protocolo técnico e fluxo de atenção em Curitiba. 2002.

Schenone, H. [Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrodectism and loxoscelism]. Rev Med Chil, v.131, n.4, Apr, p.437-44. 2003.

Schenone, H. e H. Reyes. [Loxoscelism. Ideas concerning its epidemiology and prevention.]. Bol Chil Parasitol, v.18, Apr-Jun, p.38-9. 1963.

Schenone, H. C. L. K., F. Resistencia induzida del conejo a dosis elevadas de veneno de *Loxosceles laeta*. Toxicon, v.8, p.285-288. 1970.

Schenone, H. S., T.; Rojas, A.; Villarroel, F. Loxoscelismo em Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, v.31, n.6, p.403-415. 1989.

Schugar, R. C., P. D. Robbins, *et al.* Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. Gene Ther, v.15, n.2, Jan, p.126-35. 2008.

Schunk, M. K. e G. E. Macallum. Applications and optimization of immunization procedures. ILAR J, v.46, n.3, p.241-57. 2005.

Sezerino, U. M., M. Zannin, *et al.* A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.92, n.5, Sep-Oct, p.546-8. 1998.

Sheriff, S., E. W. Silvertown, *et al.* Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.22, Nov, p.8075-9. 1987.

Shinnick, T. M., J. G. Sutcliffe, *et al.* Synthetic peptide immunogens as vaccines. Annu Rev Microbiol, v.37, p.425-46. 1983.

Silvestre, F. G., C. S. De Castro, *et al.* Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). Toxicon, v.46, n.8, Dec 15, p.927-36. 2005.

Sinan- Ministerio da Saúde, Brasil. 2007.

Smith, C. G. e J. R. Vane. The discovery of captopril. FASEB J, v.17, n.8, May, p.788-9. 2003.

Sompuram, S. R., V. Kodela, *et al.* Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. Clin Chem, v.48, n.3, Mar, p.410-20. 2002.

Srairi-Abid, N., P. Mansuelle, *et al.* Purification, characterization and molecular modelling of two toxin-like proteins from the *Androctonus australis* Hector venom. Eur J Biochem, v.267, n.17, Sep, p.5614-20. 2000.

Stills, H. F., Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILARJ, v.46, n.3, p.280-93. 2005.

Stoye, J., V. Moulton, *et al.* DCA: an efficient implementation of the divide-and-conquer approach to simultaneous multiple sequence alignment. Comput Appl Biosci, v.13, n.6, Dec, p.625-6. 1997.

Swanson, D. L. e R. S. Vetter. Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. N Engl J Med, v.352, n.7, Feb 17, p.700-7. 2005.

_____. Loxoscelism. Clin Dermatol, v.24, n.3, May-Jun, p.213-21. 2006.

Tambourgi, D. V., F. F. P. M. De, *et al.* Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. Mol Immunol, v.41, n.8, Jul, p.831-40. 2004.

Tambourgi, D. V., M. De Sousa Da Silva, *et al.* Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. Immunology, v.107, n.1, Sep, p.93-101. 2002.

Tambourgi, D. V., F. C. Magnoli, *et al.* Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. Biochem Biophys Res Commun, v.251, n.1, Oct 9, p.366-73. 1998.

_____. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. J Immunol, v.155, n.9, Nov 1, p.4459-66. 1995.

Tambourgi, D. V., B. P. Morgan, *et al.* *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. Blood, v.95, n.2, Jan 15, p.683-91. 2000.

Tambourgi, D. V., D. Paixao-Cavalcante, *et al.* *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. J Invest Dermatol, v.124, n.4, Apr, p.725-31. 2005.

Tambourgi, D. V., M. F. Pedrosa, *et al.* Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. Mol Immunol, v.44, n.4, Jan, p.576-82. 2007.

- Tambourgi, D. V., V. L. Petricevich, *et al.* Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. Toxicon, v.36, n.2, Feb, p.391-403. 1998.
- Tavares, F. L., M. C. Sousa-E-Silva, *et al.* Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. Hum Exp Toxicol, v.23, n.10, Oct, p.477-86. 2004.
- Toro, A. F., M. B. Malta, *et al.* Role of IgG(T) and IgGa isotypes obtained from arachnidic antivenom to neutralize toxic activities of *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* and *Tityus serrulatus* venoms. Toxicon, v.48, n.6, Nov, p.649-61. 2006.
- Tulip, W. R., J. N. Varghese, *et al.* Refined crystal structure of the influenza virus N9 neuraminidase-NC41 Fab complex. J Mol Biol, v.227, n.1, Sep 5, p.122-48. 1992.
- Van Den Berg, C. W., R. M. De Andrade, *et al.* *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHCI and induces protection against C-mediated lysis. Immunology, v.107, n.1, Sep, p.102-10. 2002.
- Van Den Berg, C. W., R. M. Goncalves-De-Andrade, *et al.* *Loxosceles* spider venom induces the release of thrombomodulin and endothelial protein C receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism. J Thromb Haemost, v.5, n.5, May, p.989-95. 2007.
- Van Meeteren, L. A., F. Frederiks, *et al.* Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. J Biol Chem, v.279, n.12, Mar 19, p.10833-6. 2004.
- Van Regenmortel, M. H. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. Biologicals, v.29, n.3-4, Sep-Dec, p.209-13. 2001.
- Van Regenmortel, M. H. V. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. Methods, v.9, n.3, Jun, p.465-72. 1996.
- Veiga, S. S., R. B. Da Silveira, *et al.* Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Toxicon, v.38, n.6, Jun, p.825-39. 2000.
- Veiga, S. S., V. C. Zanetti, *et al.* Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. Braz J Med Biol Res, v.34, n.7, Jul, p.843-50. 2001.
- Vetter, R. S. Brown recluse spider bite diagnoses and lawsuits. Pediatr Emerg Care, v.19, n.4, Aug, p.291-2. 2003.

Vetter, R. S., P. E. Cushing, *et al.* Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. Toxicon, v.42, n.4, Sep 15, p.413-8. 2003.

Vetter, R. S. e P. K. Visscher. Bites and stings of medically important venomous arthropods. Int J Dermatol, v.37, n.7, Jul, p.481-96. 1998.

Villard, S., S. Lacroix-Desmazes, *et al.* Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. Blood, v.102, n.3, Aug 1, p.949-52. 2003.

Wasserman, G. S. e P. C. Anderson. Loxoscelism and necrotic arachnidism. J Toxicol Clin Toxicol, v.21, n.4-5, p.451-72. 1983.

Wendel, T. D. The emergency medicine workforce. Ann Emerg Med, v.42, n.2, Aug, p.307-8; author reply 308-9. 2003.

White J, C. J., Fan Hw. Clinical toxicology of spider bites, v.1. 1995 (Handbook of Clinical Toxicology in Animal Venoms and Poisons.)

Anexos

9 ANEXOS

A primeira parte deste trabalho foi compilada em um artigo publicado em 2006, na TOXICON, intitulado: 'Functional characterization and epitope analyses of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider', este arquivo encontra-se em anexo.

Para a segunda parte do trabalho, em relação aos peptídeos localizados com soro de cavalo anti-loxoscélico, um artigo intitulado 'Immunization with synthetic peptides from phospholipase D toxins of *Loxosceles intermedia* spider venom induce dermonecrosis protection', com os autores: Felicori L., Fernandes P.B., Giusta M, Kalapothakis E., Nguyen C., Molina F., Granier C., Chavez-Olortegui C. esta em fase final de preparação.

Na terceira parte do trabalho, que diz respeito aos peptídeos conformacionais, em anexo, está o artigo intitulado 'Molecular basis for the neutralizing capacity of a monoclonal antibody against the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* venom'. Este artigo foi submetido ao FEBS Journal. Entretanto, os revisores solicitaram a realização do estudo de mutâgene sitio dirigida, o que foi iniciado neste trabalho de tese. (ANEXO)

OUTROS TRABALHOS GERADOS DURANTE A REALIZAÇÃO DESTA TESE

Em relação a epitopos conformacionais, um outro trabalho, utilizando o programa recentemente desenvolvido, PEPOP (Moreau *et al.*, 2008) foi realizado com uma proteína escorpionica. Este trabalho foi recentemente submetido à Molecular Immunology (ANEXO). Com relação à técnica de phage display e um outro uso de peptídeos sintéticos, agora no que se diz respeito ao seu uso em diagnostico, recentemente o artigo intitulado: 'Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display' foi aceito, mediante pequenas modificações, para publicação na revista 'Clinical Immunology' (ANEXO).

Em paralelo a esses trabalhos e em colaboração com a Fundação Ezequiel Dias desenvolvemos, realizamos um estudo com uma proteína ativadora de plasminogênio do veneno da serpente *Lachesis muta muta*. Nesses trabalhos, caracterizamos esta proteína

evimos que esta é encontrada entre as serpentes brasileiras, somente neste gênero de serpente, o que a torna um potencial diagnóstico para pacientes picados por este gênero de serpentes (Artigos anexos). Como perspectivas destes trabalhos com *Lachesis*, estamos realizando o mapeamento de epitopos desta proteína ativadora de plasminogênio.

Em anexo também está um CD contendo a tese completa e uma biblioteca do *end note* contendo todas as referências citadas na tese e também nesta biblioteca é possível visualizar o resumo dos artigos e há o link para cada um dos artigos. Todas as referências bibliográficas foram formatadas de acordo com o padrão ABNT do *end note*.