

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

IMUNORREATIVIDADE CRUZADA ENTRE TOXINAS
OFÍDICAS REVELADA POR ANTICORPOS ANTI-
PEPTÍDEO SINTÉTICO

Felipe Roberti Teixeira

Ribeirão Preto-SP
Março 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Felipe Roberti Teixeira

IMUNORREATIVIDADE CRUZADA ENTRE TOXINAS
OFÍDICAS REVELADA POR ANTICORPOS ANTI-
PEPTÍDEO SINTÉTICO

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira

Ribeirão Preto-SP

Março 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Felipe Roberti

Imunorreatividade entre toxinas ofídicas revelada por anticorpos anti-peptídeo sintético– Ribeirão Preto, 2007. 82 p.;

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP, Departamento de Bioquímica e Imunologia
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira

1- Imunorreatividade cruzada; 2- BApNA-hidrolase; 3- peptídeos sintéticos; 4- toxinas ofídicas; 5- anticorpos antipeptídeo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Roberti Teixeira

IMUNORREATIVIDADE CRUZADA ENTRE TOXINAS OFÍDICAS REVELADA POR
ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEO SINTÉTICO

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Bioquímica.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ **Assinatura** _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ **Assinatura** _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ **Assinatura** _____

DEDICATÓRIA

A você que abriu mão dos seus sonhos para que os meus se realizassem,
A você que com um sorriso no rosto sempre me estendeu a mão,
A você que me deu exemplo de respeito, humildade, força e coragem,
A você que hoje, só, alicerça minha família querida,
Mãe, Deus te deu dois pilares capazes de suportar os mais pesados
fardos,
Deus te deu a vida e me presenteou com sua presença,
A você, mãe, dedico esta e todas as realizações da minha vida.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida;

A espiritualidade amiga, pelo amparo constante;

A minha mãe, Maria Antonieta, pelo amor que nos é dado e por toda dedicação e esforço em tornar simples os maiores obstáculos da minha vida;

Aos meus irmãos; André, Gustavo e Priscilla por serem os braços a me apoiarem nas dificuldades e as mãos a me empurrarem na direção dos meus sonhos, sou muito feliz por Deus ter permitido viver ao lado de vocês;

Ao meu pai, Geraldo, por todo incentivo durante toda sua vida, sei que apesar de não estar mais entre nós, o senhor jamais deixa de me apoiar;

Aos meus avós, Roberto e Antonieta, que recentemente se foram desta vida, mas que deixaram ideais de simplicidade e humildade que guardarei por toda vida;

Ao meu orientador, professor Eduardo Brandt de Oliveira, pela incontestável dedicação na minha formação acadêmica, por saber me contagiar com seu amor à ciência, por ensinar a essência e origem do conhecimento, por mostrar como fazer ciência de forma consciente e séria, por ensinar o verdadeiro sentido da palavra professor e por me honrar nesses dois anos com sua orientação. O senhor sempre será um exemplo de pesquisador e um modelo ao qual eu pretendo me espelhar na minha carreira acadêmica. Muito obrigado!

Aos professores Cláudio M.C. Neto e Marcelo D. Gomes pela disponibilidade de utilização de seus laboratórios e pelas discussões científicas que muito colaboraram para o amadurecimento de nosso espírito científico;

As minhas amigas/irmãs Sami (Doctor) e Rosana (Rose), pela ajuda imediata em momentos difíceis, pelos conselhos, pelo carinho, pelas brincadeiras que tornam melhores nossos dias e principalmente pela amizade de vocês, que a cada dia se fortalece e me faz acreditar no verdadeiro sentido do amor ao próximo;

A minha amiga e ex-companheira de trabalho Laura Letícia, por tudo que me ensinou no laboratório, pelas discussões científicas que me ajudaram a adquirir conhecimento e pela sua amizade sempre presente;

A Marília (Mary), pelo seu contagiante bem estar com a vida, a sua amizade me ensina cada dia a dar menos importância aos problemas da vida, me mostrando soluções práticas e simples; por sua força de vontade que sempre me inspira;

A Letícia (Lelê), que com seu exemplo de seriedade e preocupação com a formação acadêmica me ensinou a buscar sempre a compreensão do que se faz e a lutar sempre pela melhoria do funcionamento do sistema educacional que fazemos parte;

A Adriana (Driana), minha futura companheira de laboratório, pela amizade sincera e divertida (principalmente depois das aulas de Inglês), por escutar meus problemas muitas vezes, pelos conselhos, pelas discussões científicas e pela boa vontade em ajudar sempre;

A Christiane (C.Becari), pela amizade, pelas discussões científicas, pelos conselhos em momentos difíceis, por escutar meus problemas sempre com muita paciência e por sempre se mostrar muito prestativa a ajudar;

A Patrícia (Patê), pela amizade, pelas discussões científicas, pela prestatividade a ajudar, pelas caronas sempre com muita boa vontade e pelo apoio e incentivo de sempre;

A Odete, pelos ótimos serviços prestados ao nosso laboratório, pela descontração no ambiente de trabalho, por estar sempre disposta a ajudar e pelos bolos e tortas deliciosas que fazia para todos nós;

A Ivone (Maria), pela boa vontade em ajudar sempre nos serviços da secretaria, por sempre avisar pra “alguém desavisado” sobre as datas e prazos que temos que obedecer e pela eficiência e organização do seu trabalho;

A Lúcia, por sempre levar alguma coisa gostosa no laboratório para que todos possam se deliciar;

Ao Luiz Henrique do Serpentário e a Denise (estagiária) pelos excelentes serviços prestados no fornecimento dos venenos para nosso trabalho e organização do serpentário;

Ao amigo Deyverson, pelos conselhos e por sempre ter uma palavra amiga em momentos difíceis;

Ao Lucas (Miolinho) e Pedro (Sangue), pela amizade descontraída e ao mesmo tempo sincera, e por fazerem bem divertidos meu dia a dia no laboratório;

Ao amigo Stefany (Teté), por sua amizade, pelos seus conselhos, pela paciência em escutar minhas reclamações, pelo companheirismo e pelas discussões acadêmico/científicas que ajudam a amadurecer meu espírito científico;

Ao Fábio Marliére, pela receptibilidade em sua casa quando cheguei a Ribeirão Preto;

Ao Hugo, por discussões científicas que me ensinaram muito e pelas ajudas na elaboração ou execução de experimentos;

Aos integrantes de outros laboratórios, Luiz e Disney, pela companhia em alguns finais de semana no laboratório, ajudando o tempo a passar;

A minha ex-namorada e família, que durante muito tempo foram minha família e muito contribuíram para minha manutenção em Ribeirão Preto, jamais abrindo mão de recursos para me ajudar nos momentos mais difíceis que passei nos últimos quatro anos;

Aos meus familiares, tios (Darci, Zilda, Custódio e Olinda), “primas nerds” (Ester, Nathália e Fabiane) e primos (Helton, Marcelo e Márcio), pelo apoio e incentivo que me ajudaram muito nessa caminhada;

Aos funcionários da limpeza, cozinha e portaria, que desempenham um papel fundamental para o desenvolvimento da pesquisa nessa faculdade;

A todos amigos e colegas que fazem parte da minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

FRASE

De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...

“*O encontro marcado*” Fernando Sabino (1956).

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS _____	xix
LISTA DE FIGURAS _____	xxii
1- INTRODUÇÃO _____	2
2- OBJETIVOS _____	10
3- MATERIAIS _____	12
3.1- Purificação de BApNA-hidrolase de veneno de <i>Crotalus durissus</i> _____	12
3.2- Síntese de peptídeo em fase sólida _____	12
3.3- Purificação do peptídeo sintético _____	12
3.4- Oxidação do peptídeo _____	13
3.5- Análise de aminoácidos _____	13
3.6- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida _____	13
3.7- Síntese das resinas de afinidade _____	14
3.8- Obtenção do conjugado peptídeo: carreador _____	14
3.9- Obtenção de anticorpos _____	14
3.10- Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade _____	14
3.11- Immunoblotting _____	15
4- MÉTODOS _____	17
4.1- Purificação de BApNA-hidrolase de veneno de <i>C. durissus</i> _____	17
4.1.1- Ensaio enzimático: _____	17
4.1.1.1- Hidrólise do BApNA _____	17
4.1.1.2- Hidrólise do BAEE _____	17
4.1.2- Seleção dos venenos _____	18

4.1.3- Precipitação isoeétrica da crotoxina _____	18
4.1.4-Cromatofocalização _____	18
4.1.5- Cromatografia de afinidade _____	19
4.1.6- Deglicosilação das BApNA-hidrolases _____	19
4.2- Síntese de peptídeo em fase sólida _____	20
4.2.1- Remoção do Fmoc _____	20
4.2.2- Acoplamento dos Fmoc-aminoácidos _____	20
4.2.3- Clivagem do peptídeo Ser ¹ -Ile ¹⁶ da resina _____	21
4.3- Purificação do Ser ¹ -Ile ¹⁶ _____	21
4.3.1- Cromatografia em cartuchos de Sep Pak C18 _____	21
4.3.2- Cromatografia líquida de alto desempenho _____	22
4.4- Oxidação do Ser ¹ -Ile ¹⁶ _____	22
4.5- Análise de aminoácidos do peptídeo sintetizado _____	23
4.5.1- Hidrólise ácida dos peptídeos _____	23
4.5.2- Determinação da composição de aminoácidos _____	23
4.6- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida _____	24
4.7- Síntese das resinas de afinidade _____	24
4.7.1- Sepharose-bisepoxi-ε-aminocaprício-p-amino-benzamidina _____	24
4.7.1.1- Ativação da Sepharose 6B por Bisepóxi _____	24
4.7.1.2- Acoplamento do ácido ε-aminocaprício _____	25
4.7.1.3- Acoplamento de p-amino-benzamidina _____	25
4.7.2-Sepharose-bisepoxi-εAC-hidrazida-Ser ¹ -Ile ¹⁵ _____	26
4.7.2.1-Acoplamento de hidrazina à resina Seph-Bx-εAC _____	26
4.7.2.2- Acoplamento de Ser ¹ -Ile ¹⁵ _____	26
4.7.3- Sepharose-IBPA-Suc-NHS-BApNA-hidrolase _____	27
4.7.3.1- Ativação de sepharose por CDI _____	27
4.7.3.2- Acoplamento de IBPA à Sepharose ativada _____	27
4.7.3.3- Succinilação de Seph-IBPA _____	28
4.7.3.4- Ativação de Seph-IBPA-Suc por NHS _____	28
4.7.3.5- Acoplamento da BApNA-hidrolase purificada de veneno de <i>C.durissus</i> _____	29

4.7.4- Suporte de vidro de poro controlado-diAP-Abu-Met-Ile ¹⁵ -Ser ¹	29
4.8- Obtenção do conjugado Ser ¹ -Ile ¹⁵ : carreador protéico	30
4.8.1- Produção do carreador protéico	30
4.8.1.1- Redução	30
4.8.1.2- Carboximetilação	30
4.8.1.3- Succinilação	31
4.8.1.4- Hidrazidação	31
4.8.2- Obtenção do conjugado	32
4.9- Obtenção de anticorpos	32
4.9.1- Anticorpos de coelho	32
4.9.1.1- Imunização de coelhos para obtenção de anticorpos anti- Ser ¹ -Ile ¹⁵	32
4.9.1.2- Anticorpos de cavalo	33
4.10- Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade	33
4.11- Immunoblotting	34
5- RESULTADOS	36
5.1- Purificação da enzima coagulante do veneno de <i>C. durissus</i>	36
5.2- Escolha do peptídeo para imunização	41
5.3- Síntese do conjugado (Ser ¹ -Ile ¹⁵ : carreador protéico)	43
5.4- Caracterização dos anticorpos	49
5.4.1- Avaliação da produção e especificidade de soros de coelho anti-Ser ¹ -Ile ¹⁵	49
5.4.2- Avaliação da especificidade dos anticorpos	51
5.4.3- Anticorpos anti-Ser ¹ -Ile ¹⁵	51
5.4.4- Anticorpos anti-Ile ¹⁵ -Ser ¹	54
5.4.5- Anticorpos anti-BApNA-hidrolase de <i>C.terrificus</i>	56
6- DISCUSSÃO	59
6.1- Purificação de BApNA-hidrolase do veneno de <i>C.durissus</i>	59
6.2- Obtenção de anticorpos de especificidade definida	59

6.2.2- Produção do conjugado _____	59
6.2.3- Escolha do peptídeo imunogênico _____	60
6.3- Análise imunoquímica de venenos ofídicos com diferentes antisoros e anticorpos purificados _____	62
6.3.1- Anticorpos com especificidade para o peptídeo Ser ¹ -Ile ¹⁵ _____	62
6.3.2- Anticorpos com especificidade para o peptídeo Ile ¹⁵ -Ser ¹ _____	64
6.3.3- Anticorpos com especificidade para proteína _____	65
6.3.4- Inibição de anticorpos de especificidade definida por Ser ¹ -Ile ¹⁶ _____	65
7- CONCLUSÕES _____	69
8- RESUMO _____	71
9- ABSTRACT _____	73
10- REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO _____	75

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Abu: ácido aminobutírico

ACN: acetonitrila

BAEE: Benzoil-L-arginil-etiléster

BAPNA: N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilina

BCG: bacillus Calmette-Guérin

CDI: carbodiimidazol

CM: carboximetil

DIPEA: N,N, diisopropiletilamina

DMF: dimetilformamida

DTT: ditiotreitól

ECL: ensaio quimioluminescente

EDAC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDTA: ácido etilenediaminotetracético

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonil

Fmoc-AA: N- α -Fmoc-aminoácido

HBTU: 2- (1H-benzotriazol-1-il)- 1,1,3,3- tetrametilurônico- hexafluorofosfato

Hobt: N-hidroxibenzotriazol

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

IBPA: 3,3'-iminobispropilamina

KLH: keyhole limpet hemocyanin

LAAO: L- aminoácido oxidase

MES: ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico

NHS: N-hidroxissuccinimida

NMP: N-metilpirrolidona

PGNase F: peptídeo N-glicosidase F

pNA: p-nitroanilina ou p-nitroanilida

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SVTLEs: snake venom thrombin-like enzyme

TEMED: N, N, N', N', tetrametiletilediamina

TFA: ácido trifluoroacético

Tis: triisopropilissano

TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico

Tris: Tris- (hidroximetil)- aminometano

TSV-PA: ativador de plasminogênio de veneno de *Trimeresurus stejnegeri*

TTBS: Tampão Tris Tween salina

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cromatofocalização do sobrenadante da precipitação isoelétrica de veneno crotálico em resina CM-Sepharose _____	38
Figura 2- Avaliação por SDS-PAGE dos produtos da deglicosilação das BApNA-hidrolases por PGNase F _____	39
Figura 3- Cromatografia de afinidade em resina Sepharose-benzamidina das frações recromatofocalizadas _____	39
Figura 4- Análise por SDS-PAGE das frações provenientes da cromatografia de afinidade recromatofocalização _____	40
Figura 5- Alinhamento de seqüências de giroxina e TSV-PA _____	41
Figura 6- Estrutura tridimensional da proteína TSV-PA _____	42
Figura 7- Identificação do peptídeo Ser ¹ -Ile ¹⁶ na seqüência da giroxina _____	42
Figura 8- Perfis de HPLC fase reversa C-18 do hexadecapeptídeo sintético Ser ¹ -Ile ¹⁶ _____	43
Figura 9- Perfis de HPLC fase reversa C-18 da oxidação do hexadecapeptídeo sintético Ser ¹ -Ile ¹⁶ _____	44
Figura 10- Análise de aminoácidos da crotamina após redução e carboximetilação _____	45
Figura 11- SDS-PAGE 12 % do carreador protéico formado a partir da crotamina _____	46
Figura 12- Perfis de HPLC fase reversa C-18 do acoplamento do peptídeo Ser ¹ -Ile ¹⁵ ao carreador protéico _____	47
Figura 13- Análise por SDS-PAGE 12 % do conjugado e do carreador protéico formado _____	48
Figura 14- Avaliação por immunoblotting da produção de anticorpos antipeptídeo _____	50
Figura 15- Avaliação da especificidade dos soros produzidos pelos coelhos imunizados _____	51
Figura 16- Avaliação por immunoblotting da imunorreatividade de anticorpos antipeptídeo purificados de soro de coelho e comercial em Seph-Ser ¹ -Ile ¹⁵ _____	53

- Figura 17-** Avaliação por immunoblotting da imunorreatividade de anticorpos purificados de soro de coelho e comercial antibotrópico e anticrotálico em Vid-Ile¹⁵-Ser¹ _____ 55
- Figura 18-** Avaliação por immunoblotting da imunorreatividade de anticorpos purificados de soro de coelho e comercial antibotrópico e anticrotálico em resina Seph-BApNA-hidrolase de *C.durissus* imobilizada _____ 57

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Venenos ofídicos são secreções glandulares predominantemente protéicas, nas quais se encontram desde peptídeos biologicamente ativos até cadeias polipeptídicas complexas. Dezenas de atividades enzimáticas foram encontradas em venenos ofídicos, muitas das quais responsáveis por sintomas e outras manifestações visíveis em vítimas de picada por serpentes, tais como necrose tecidual, dor, e coagulação ou inibição da coagulação sanguínea (Berger et al., 1989). Os efeitos sobre os mecanismos hemostáticos da coagulação são em grande parte decorrentes da atividade de serino-proteases semelhantes à trombina, que frequentemente recebem a denominação SVTLEs, do Inglês “snake venom thrombin-like enzyme”. Cerca de 100 toxinas ofídicas foram descritas como SVTLEs (Marsh and Williams, 2005), pertencentes a 35 diferentes espécies de serpentes (Pirkle, 1998). Através do alinhamento de 30 estruturas primárias de SVTLEs verificou-se que o grau de similaridade entre elas variava de 51 a 98%, mostrando o quanto essas estruturas protéicas são conservadas entre as diferentes espécies. Os valores de similaridade obtidos quando as mesmas SVTLEs foram alinhadas a serino-proteases clássicas (quimiotripsina, trombina, calicreína, tripsina) estão entre 30 e 40%. Além da semelhança entre suas seqüências primárias, ainda foi demonstrado por estudos filogenéticos, que as SVTLEs são homólogas uma vez que possuem a trombina como ancestral comum (Castro et al., 2004).

Estudos cristalográficos permitiram a determinação da estrutura tridimensional de um ativador de plasminogênio presente no veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA) (Parry et al., 1998), o qual possui elevados índices de similaridade com as demais

SVTLEs, variando de 53 a 74% (Castro et al., 2004). A estrutura desta proteína foi utilizada como um protótipo em estudos de modelamento de proteínas na família das serino-proteases de venenos de *Bothrops alternatus* (Vitorino-Cardoso et al., 2006), *Lachesis muta* (Castro et al., 2001) e *Bothrops jararaca* (Henriques et al., 2004), o que mostrou que estas enzimas têm possivelmente estruturas tridimensionais muito semelhantes. Recentemente foram deduzidas as estruturas cristalográficas de duas serino-proteases de *Agkistrodon actus*, mostrando que ambas apresentam alta similaridade estrutural com TSV-PA como indicado pela distribuição tridimensional dos carbonos alfa das estruturas comparadas (Zhu et al., 2005).

Um dos desafios enfrentados no desenvolvimento de kits de ELISA para imunodiagnósticos rápidos que possam ser utilizados na identificação do veneno no soro de acidentados ofídicos é a existência de proteínas similares em venenos ofídicos de espécies distintas ou de epítomos comuns entre proteínas de diferentes venenos, o que poderá levar à ambigüidade na identificação da espécie responsável pelo acidente ofídico como consequência da baixa seletividade dos anticorpos utilizados. Em 2003, a Organização Mundial de Saúde (WHO) promoveu um encontro com autoridades representativas de dezenas de países para discutir o progresso e a padronização da soroterapia anti-toxinas. A soroterapia monovalente, que faz uso de soro produzido em animais imunizados com venenos de animais representativos de uma única espécie, ao invés da polivalente, que faz uso de soro que é produzido por animais imunizados com venenos de serpentes de várias espécies foi priorizada para acidentados ofídicos por duas razões principais: 1) possuir maior efetividade por dose de IgG, uma vez que os anticorpos são específicos para aquele tipo de veneno não contendo imunoglobulinas contra proteínas de outros venenos que diluiriam o soro; 2) por levar a uma menor

reação de hipersensibilidade no paciente, conhecida como “doença do soro”, uma vez que, sendo mais efetivo, menores doses do soro monovalente serão necessárias para o tratamento do paciente, o que diminui a resposta imune do paciente contra esses “antígenos” exógenos (Theakston et al., 2003). Por isso, para um bom prognóstico de um acidentado ofídico, a identificação da espécie causadora do acidente é de fundamental importância por permitir a utilização de soroterapia monovalente.

Githes e Butz (1929) mostraram que soro de animal imunizado com veneno de *Crotalus atrox* efetivamente neutraliza venenos de cinco outras espécies. A partir de então, esse fenômeno ficou conhecido por neutralização paraespecífica. A imunorreatividade cruzada entre toxinas ofídicas é a base dessa atividade em alguns soros monovalentes (Minton, 1979).

Estudos da imunologia de venenos foram iniciados antes da descoberta dos anticorpos, quando foi demonstrado que soro de animais tratados com doses não letais de veneno de *Vipera aspis* continha substâncias capazes de neutralizar a atividade desse veneno (Phisalix e Bertrand, 1897ab). O primeiro relato de imunorreatividade cruzada foi feito logo após a descoberta da existência dos anticorpos, baseado em exemplos obtidos com soros preparados contra certas substâncias ou misturas, que reagiam com múltiplos antígenos (Landsteiner, 1897). Esse fenômeno começou a ser estudado nos primórdios do século XX, quando os venenos ofídicos passaram também a ser importantes objetos de estudo. O trabalho que originalmente descreveu a imunorreatividade cruzada em venenos de serpentes relatou que antisoro produzido contra veneno de *Naja* reagia também com veneno de *Vipera russelli* em testes de precipitação realizados contra o veneno homólogo e os de diferentes espécies (Lamb, 1902).

A origem da reatividade imunológica cruzada, que é freqüentemente observada com soros antiofídicos e em investigação imunoquímica de venenos deve-se, em grande parte, às relações filogenéticas entre as espécies das serpentes consideradas, refletindo as semelhanças estruturais entre toxinas homólogas dos diversos venenos. Mais do que isto, é amplamente aceito que reações imunológicas cruzadas envolvam interações entre proteínas funcionalmente relacionadas presentes em venenos de diferentes espécies (Rael et al., 1986; Henderson e Bieber, 1986; Martinez et al., 1989; Choumet et al., 1991; Nakamura et al., 1992; Tan et al., 1993; Harrison et al., 2003). Contudo, em um número restrito de trabalhos, em que foram usadas toxinas bem definidas estrutural e funcionalmente, mostrou-se que a reatividade cruzada em venenos de serpentes pode também envolver proteínas funcionalmente não relacionadas (Tan e Ponnudurai, 1994; Tan et al., 1993). Recentemente, Stábeli et al. (2005) propuseram que esta modalidade de reatividade imunológica cruzada, que ocorre entre componentes funcionalmente não relacionados de venenos, envolve anticorpos cujos mecanismos de reconhecimento antigênico dependem de adaptação conformacional recíproca entre antígeno e anticorpo. Minton (1979) e Boquet (1979) já haviam sugerido que, em alguns casos, existia uma aparente falta de correlação entre reatividade cruzada e relação filogenética das espécies cujos venenos haviam sido estudados, uma indicação de que múltiplos fatores contribuem para este fenômeno imunológico.

Reatividade imunológica cruzada já foi descrita com inúmeros tipos de antígenos; como exemplo, a IgE monoclonal SPE7, produzida contra o hapteno 2,4-dinitrofenil (DNP), liga-se a muitos outros compostos não relacionados, como vermelho de alizarina e furazolidona, com constantes de dissociação similares à obtida para o DNP (James et al. 2003). A origem desta múltipla especificidade de um mesmo anticorpo, condição

esta suficiente para gerar reatividade cruzada, tem sido estudada sob a ótica da maturação da afinidade dos anticorpos através de investigação cristalográfica e por ressonância nuclear magnética de complexos antígeno-anticorpo (Cauerff et al., 2004; Yin et al., 2003; David et al., 2006; Demirel et al., 2005; Jimenez et al., 2004; Sethi et al., 2006; Yin et al., 2001; Notkins, 2004), mostrando que anticorpos maduros ligam-se mais especificamente aos haptenos imunogênicos do que os anticorpos produzidos por células da linhagem germinativa. O processo de maturação de afinidade é decorrente de mutações somáticas que ocorrem nos linfócitos, acarretando alterações na afinidade dos anticorpos pelos haptenos, sendo selecionados os mutantes que produzem aumento da especificidade (French et al., 1989).

Alguns peptídeos livres ou segmentos internos de proteínas apresentam flexibilidade estrutural, o que pode contribuir para a produção de anticorpos de várias especificidades e, conseqüentemente, ser uma fonte adicional de reatividade cruzada (Campbell et al., 2000). Stábeli et al., (2005) mostraram que anticorpos purificados de soro antibotrópico comercial por afinidade contra o peptídeo Ile¹-Hse¹¹, um fragmento isolado da enzima L- aminoácido oxidase (LAAO) do veneno de *B. moojeni*, reconheceram, em immunoblot, diversas proteínas com diferentes massas moleculares neste e em outros venenos. As proteínas do veneno de *B. moojeni* que apresentaram reação cruzada foram purificadas e identificadas por microseqüenciamento, encontrando-se entre elas a própria LAAO que contém uma alça externa com o segmento análogo ao peptídeo Ile¹-Hse¹¹, duas serino-peptidases e uma fosfolipase A2. Estas últimas proteínas não apresentam qualquer seqüência semelhante ao undecapeptídeo Ile¹-Hse¹¹ ou função relacionada à LAAO. O peptídeo Ile¹-Hse¹¹ foi capaz de inibir a interação dos anticorpos preparados por afinidade com as proteínas

do veneno, corroborando a idéia de que similaridade de seqüência não contribuiu para a reatividade cruzada do anticorpo específico com os demais componentes do veneno, uma vez que estes não apresentam a seqüência do fragmento Ile¹-Hse¹¹ e, apesar disto, tiveram suas interações com os anticorpos abolidas pelo peptídeo.

Existem outras implicações de ordem prática na existência de reatividade cruzada em antivenenos para fins terapêuticos. Recentemente, foi aventado o uso de seqüências polipeptídicas filogeneticamente conservadas na produção de soros para induzir proteção cruzada contra toxinas importantes de venenos de várias espécies (Harrison et al., 2003); por outro lado, foi sugerido que imunorreatividade cruzada entre componentes não relacionados filogeneticamente pode acarretar perda de potência de soros antiofídicos para certas toxinas, cujos anticorpos seriam espoliados através de interações com frações atóxicas ou pouco tóxicas dos venenos (Stábeli et al., 2005).

Nosso entendimento sobre a imunoreatividade cruzada em venenos ofídicos tem sido prejudicado pelos diferentes protocolos experimentais utilizados para sua demonstração, como por exemplo: 1) fonte dos anticorpos utilizados, monovalente, polivalente ou anti-toxinas específicas; 2) o objeto de estudo a ser utilizado, venenos brutos ou frações bem caracterizadas; 3) o tipo de ensaio utilizado para avaliar a imunorreatividade cruzada, ELISA, ensaios de precipitação ou immunoblotting (Stábeli et al., 2005). Essas variáveis impossibilitam a combinação do conhecimento gerado, limitando cada evidência às suas próprias condições experimentais e, por isso, o termo imunorreatividade cruzada vem sendo utilizado promiscuamente na grande maioria dos trabalhos envolvendo imunquímica de venenos. O uso de antivenenos para avaliar a ocorrência desse fenômeno contribui pouco para a sua compreensão, pois nessas misturas existem inúmeros anticorpos produzidos contra uma variedade de epítomos

presentes nos venenos, obscurecendo a compreensão da intimidade dos mecanismos da imunorreatividade cruzada. Apesar do número expressivo de relatos na literatura, nota-se que há dificuldades em se interpretar certos resultados de imunquímica de venenos, e pouco se evoluiu no entendimento da imunorreatividade cruzada desde seu primeiro relato em 1902.

Nenhum estudo avaliando a imunorreatividade cruzada de anticorpos produzidos especificamente contra um peptídeo sintético correspondente a um segmento de proteína de veneno ofídico foi encontrado na literatura. Esse tipo de estudo poderia contribuir para um aprofundamento no nível de discussão sobre imunorreatividade cruzada em venenos ofídicos uma vez que faz uso de um novo modelo experimental.

No presente trabalho abordamos o estudo da imunorreatividade cruzada de venenos ofídicos usando reagentes imunquímicos, antígeno e anticorpo, cujas estruturas e especificidades apresentam alto grau de definição conseguida por síntese de fragmentos de toxinas. A estrutura tridimensional do ativador de plasminogênio TSV-PA foi utilizada como ponto de partida para a escolha de peptídeos com certas características das SVTLEs para obtenção de soros anti-peptídicos com propriedades anti-SVTLEs. Nós descrevemos os resultados obtidos com um peptídeo sintetizado quimicamente e utilizado para imunização de coelhos cujos soros, juntamente com soros comerciais antibotrópico e anticrotálico foram utilizados como fonte de anticorpos para estudos imunquímicos de reatividade cruzada entre venenos de diferentes espécies de serpentes.

2- OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

- Compreensão da natureza do fenômeno da imunorreatividade cruzada em venenos ofídicos.

2.2- Objetivo específico

- O presente trabalho teve como objetivo avaliar a imunorreatividade cruzada de anticorpos anti-peptídeo em ensaios com venenos ofídicos.

3- MATERIAIS

3- MATERIAIS

3.1- Purificação de BApNA-hidrolase de veneno de *Crotalus durissus*

Os venenos de *C.durissus* foram obtidos do Serpentário do Campus da USP-Ribeirão Preto e mantidos secos a 4°C até uso. Os venenos crotálicos usados para purificação da enzima BApNA-hidrolase foram extraídos dos exemplares n^{os} 90712 e 103491, cujos conteúdos de atividade sobre o substrato BApNA eram mais altos entre 10 venenos individualmente testados (os conteúdos de atividade para hidrólise de BApNA, expressos em u/mg variaram até 11 x nas amostras analisadas).

O substrato BApNA, membrana cut off 3000 Da e a enzima PGNase F (Sigma), Tris (Pharmacia Biotech), NaCl (Panreac), ácido cítrico (Pierce), , ácido acético (Synth). O tampão formato de sódio foi preparado a partir de ácido fórmico (Baker) e NaOH (Panreac). CM-Sepharose e Polibuffer96 foram obtidos da Pharmacia Fine Chemicals. Os equipamentos utilizados foram: espectrofotômetro Beckman DU-2 (modificado pela Incibrás), banho 37°C (Fanem LTDA), centrífuga (Clay Adams), pHmetro (Analion).

3.2- Síntese de peptídeo em fase sólida

Fmoc aminoácidos, resina Rink amida, NMP, Hobt hidratado e HBTU foram obtidos da Advanced Chemtech. DMF e metanol (J.T.Baker), Tis e DIPEA (Aldrich), TFA (Vetec), piperidina (Fluka), TNBS (Pierce).

3.3- Purificação do peptídeo sintético

Cartuchos Sep Pak C18 para pré-purificação de peptídeos brutos foram obtidos da Waters, acetonitrila (J.T.Baker). Para avaliação e purificação do peptídeo sintetizado

utilizou-se HPLC de fase reversa num equipamento Shimadzu SCL-6B acoplado a uma coluna Vydac C-18.

3.4- Oxidação do peptídeo

Imidazol e NaIO_4 foram obtidos da Sigma.

3.5- Análise de aminoácidos

Ácido metanossulfônico 4 N contendo 0,2% de triptamina foi obtido da Pierce, padrão de aminoácidos (Sigma), capilares de vidro (Merse) e glicerol (Merck). As análises de aminoácidos foram realizadas em um analisador de aminoácidos automático equipado com uma coluna (22 X 0,6 cm) empacotada com resina Beckman W-3, sistema de coluna única. A sensibilidade do método é de 0.5-10 nmol/resíduo, com detecção por ninidrina.

3.6- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

SDS e glicina foram obtidos da Pharmacia Biotech, corante para detecção de proteínas (Coomassie R-250) e TEMED (Sigma), persulfato de amônio e DTT (USB Corporation, Cleveland, USA), acrilamida (Pierce), bisacrilamida (Bio Rad) e Tris (Serva). O marcador de peso molecular de proteínas foi obtido da Fermentas (Hanover, MD, Estados Unidos). O sistema de eletroforese (Mini-Protean3) foi obtido da Bio-Rad (Hercules, SA, Estados Unidos). As soluções estoques foram as seguintes: tampão para gel de separação (acrilamida 12% p/v, bisacrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 375mM pH 8,8 e SDS 0,1% p/v) e o gel de concentração (acrilamida 3% p/v, bisacrilamida 0,1% p/v, Tris-HCl 125 mM pH 6,8 e SDS 0,1% p/v), persulfato de amônio 10%, tampão de

corrida da eletroforese (Tris base 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1%, pH 8,3), tampão das amostras das proteínas (concentrado 2x: Tris-HCl 20 mM, glicerol 10 %, SDS 1 % e azul de bromofenol 0,05 %) e água destilada.

3.7- Síntese das resinas de afinidade

A resina Sepharose 6B foi obtida da Pharmacia, funil de placa porosa (Vidrolabor), NaBH₄ (Synth), bisepóxi, ácido ε-amino capróico, MES, EDAC, hidrazina 30%, p-aminobenzamidina, etanolamina, MnCl₂, NHS, IBPA e resina de vidro de poro controlado foram obtidos da Sigma, reagente de Ellman (5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)) (Aldrich), β-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech), bicarbonato de sódio (Merck).

3.8- Obtenção do conjugado peptídeo: carreador

EDTA, ácido iodoacético e anidrido succínico (Sigma), cloreto de guanidino (BRL, Bethesda, MD)

3.9- Obtenção de anticorpos

O reagente completo de Freund foi preparado a partir de adjuvante incompleto (9:1 nujol:aralcel A) adicionado de BCG (Butantan). Centrífuga refrigerada (Sorvall), soro antibotrópico e anticrotático, com validade vencida para uso terapêutico (Butantan).

3.10- Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade

As colunas de plástico utilizadas para o empacotamento das resinas de afinidade bem como os filtros inferior e superior foram obtidos da Supelco.

3.11- Immunoblotting

Membrana de nitrocelulose (Hybond ECL) foi obtida da Amershan Pharmacia (Piscataway, NJ, Estados Unidos), peroxidase (Sigma), leite mólculo. As soluções utilizadas foram: solução salina tamponada em Tris com Tween 0,05% (TTBS; 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH7,5, 0,1% (v/v) de Tween (USB corporation), sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot SD, Bio-Rad), tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris-base-HCl pH 8,3, 20% (v/v) de metanol e 0,1% (p/v) de SDS), Soluções A e B (Luminol Reagent Solution A e Solution B, Santa Cruz Biotechnology), filme e as respectivas soluções: reveladora, composta de água (85-90%), metabissulfito de sódio (5-10%) e hidroquinona (2%), e fixadora, composta de água (80-85%), tiosulfato de amônio (5-10%) e tiocianato de amônio (5-10%) foram obtidos da Kodak.

4- MÉTODOS

4- MÉTODOS

4.1- Purificação de BApNA-hidrolase de veneno de *C. durissus*

4.1.1- Ensaio enzimáticos:

4.1.1.1- Hidrólise do BApNA

Para avaliação da atividade de BApNA-hidrolase nos venenos estudados foi utilizado ensaio colorimétrico utilizando BApNA como substrato, conforme Alexander et al., 1988, com modificações . Após ação enzimática, há liberação de pNA, um composto de coloração amarelada que absorve em comprimento de onda de 410 nm. O ensaio enzimático foi realizado da seguinte forma: adicionou-se a 300 μL de solução de BApNA 10 mM em Tris-HCl 90 mM pH 8,1 com 150 mM de NaCl um volume de amostra conhecido, suficiente para gerar uma coloração levemente amarelada após 30 min de reação a 37°C. Após esse período parou-se a reação pela adição de 500 μL de ácido cítrico 5% (v/v) e verificou-se absorvância a 410 nm. O valor obtido juntamente com o coeficiente de absorvância molar da pNA ($8800 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) foi utilizado para o cálculo do número de unidades enzimáticas recuperados após cada processo de purificação.

4.1.1.2- Hidrólise do BAEE

Para avaliação da atividade esterásica das BApNA-hidrolases do veneno avaliou-se sua atividade sobre o substrato BAEE, conforme Bergmeyer (1974). Para isso, adicionou-se a uma solução de enzima 1:100 (100 μL) 1,5 mL de solução de

BAEE 0,25 mM em tampão fosfato de sódio 70 mM pH 7,6. Após 5 min de reação à temperatura de 30 °C, foi feita a leitura a 253 nm.

4.1.2- Seleção dos venenos

Foi feita avaliação da atividade de BApNA-hidrolase em venenos secos de 10 serpentes de *C.durissus* identificadas eletronicamente pela leitura do número do seu chip. Os venenos das serpentes que mostraram maior atividade sobre o substrato BApNA foram selecionados para serem submetidos a purificação de BApNA-hidrolases.

4.1.3- Precipitação isoeétrica da crotoxina

Aproximadamente 100 mg dos venenos selecionados foram dissolvidos em 10 mL de Tris-HCl 25 mM pH 7,2 e a solução centrifugada a 14000 rpm por 2 min em microcentrifuga. O sobrenadante obtido foi submetido à diálise, em membrana cut off 10000 Da, contra 1 L de tampão formato de sódio 20 mM pH 4,75, sob agitação em banho de gelo. Após 2 h o tampão foi trocado e deixou-se durante a noite a 4°C. O denso precipitado que se formou foi removido por centrifugação a 5000 rpm por 10 min e, ao sobrenadante recolhido, foram adicionados 600 µL de Tris-HCl 1M pH 8,1 para neutralização do pH. Esta solução foi utilizada para posterior purificação de proteínas com atividade sobre BApNA.

4.1.4-Cromatofocalização

A purificação por cromatofocalização foi feita conforme Sluyterman et al., 1978, com modificações. Para tal, dialisou-se 1,3 mL do sobrenadante da etapa anterior contra acetato de amônio 20 mM pH 4,5. Em seguida, aplicou-se essa amostra, ao fluxo

de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, em uma coluna CM-Sepharose previamente lavada com HCl 0,1 M e equilibrada no mesmo tampão utilizado para diálise. A eluição foi feita nesse mesmo fluxo com Polibuffer94 1:10 (v/v) pH 7,2. Foram coletadas frações de 1 mL cujos valores de absorvância a 280 nm e de pH foram obtidos após leitura manual. As atividades de BApNA-hidrolases foram analisadas em cada tubo por atividade sobre BApNA.

4.1.5- Cromatografia de afinidade

Foi utilizada a resina Sepharose-bisepoxi- ϵ -aminocapróico-p-amino-benzamidina, cuja produção foi descrita no item 4.7. Sobre a resina, previamente equilibrada em Tris-HCl 0,1 M com 0,1 M de NaCl, aplicou-se a amostra. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 volumes de coluna (vc) seqüencialmente com o tampão de equilíbrio, e em seguida NaCl 0,15 M. O primeiro passo da eluição foi feito com acetato de sódio 50 mM pH 4,75 com NaCl 0,1 M seguido por formato de sódio 50 mM pH 3,0 com 0,1 M de NaCl. As frações eluídas foram coletadas em tubos contendo Tris-HCl 1 M pH 8,1.

4.1.6- Deglicosilação das BApNA-hidrolases

Essa reação enzimática foi feita conforme Glyko's, 1998, com modificações. A mistura de reação foi composta por: 10 μL das frações contendo BApNA-hidrolase, 15 μL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5 e 3 μL da enzima PGNase F. A reação foi deixada durante a noite a 37°C e terminada pela adição do tampão de amostra para SDS-PAGE contendo DTT.

4.2- Síntese de peptídeo em fase sólida

As sínteses dos peptídeos foram realizadas em fase sólida pela estratégia Fmoc convencional (Chan e White, 2000), cujos detalhes estão descritos abaixo. O peptídeo sintetizado foi **SSEHIAPLSLPSSPPI**, denominado Ser¹-Ile¹⁶.

4.2.1- Remoção do Fmoc

A resina Rink-amida (250 mg; 0,175 meq) foi inicialmente suspensa em 5 mL de DMF para inchar (15 min) e transferida para o reator de vidro com placa porosa com capacidade apropriada para esta quantidade de resina. Após 7 ciclos de lavagem (3 mL de DMF; 20 s de agitação com N₂; aspiração) com auxílio de sistema automatizado e do programa Sole_250.bs2, procedeu-se à remoção do Fmoc protetor do grupo amino por adição manual de 2 x 3 mL de piperidina (20% em DMF) sobre a resina e incubação por 3 e 7 min após as respectivas adições, com agitação por N₂. A resina desbloqueada, cuja presença de grupos amina livres foi demonstrável por reação com TNBS 0,1% em metanol, na presença de DIPEA 0,5 M, foi lavada 7x com DMF, como descrito acima.

Este processo de remoção de Fmoc de grupos amina foi também usado durante as etapas de alongação da cadeia peptídica.

4.2.2- Acoplamento dos Fmoc-aminoácidos

Cada aminoácido Fmoc-AA foi pesado, com um excesso molar de 2,5 vezes, e dissolvido em 0,7 mL de DMSO/NMP (20%DMSO/NMP sob peneira molecular 4 Å para remoção de moléculas de água), acrescido de 0,97 mL de HBTU/HOBt 0,45 M (0,46 g de HOBt hidrato, 1,11 g de HBTU e 6 mL de DMSO/NMP) e incubado por 3 min antes

de ser adicionado à resina enxuta, desbloqueada e condicionada com DMSO/NMP. Após agitação por N₂, adicionou-se 0,59 mL de DIPEA 1,5 M (peneira molecular 4 Å), seguindo-se 6 pulsos de microondas de 1 min em 10 % de sua potência máxima (o que equivale a 80W) com intervalos para refrigeração do reator. Todos os reagentes estavam presentes em excesso molar de 2,5 vezes em relação ao grau de derivatização da resina Rink (0,7 mmol/g).

4.2.3- Clivagem do peptídeo Ser¹-Ile¹⁶ da resina

Após desbloquear o Fmoc-peptídeo com o auxílio do programa Sole_250.bs2, o DMF foi removido da resina através das lavagens: 2 vezes de 3 mL de NMP; 5 vezes de 3 mL de metanol. Com a resina seca procedeu-se a clivagem do peptídeo por adição de 2,5 mL de TFA/H₂O/Tis (94% de TFA, 3% de H₂O e 3% de Tis) e incubação por 2 h à temperatura ambiente sob agitação.

4.3- Purificação do Ser¹-Ile¹⁶

4.3.1- Cromatografia em cartuchos de Sep Pak C18

A obtenção dos peptídeos brutos foi conseguida por cromatografia em cartuchos de Sep Pak^R C18, como segue: após clivagem, o sobrenadante da reação foi ressuspenso em 120 mL de solução de acetonitrila 5% para diluição do TFA até a concentração de aproximadamente 2,0%. Centrifugou-se esse material e o sobrenadante foi aplicado na coluna previamente equilibrada com esta solução diluente. Após aplicação da amostra e lavagem da coluna com 10 mL de solução de 5% acetonitrila/0,1% TFA, os peptídeos retidos foram recuperados por passagem de

solução contendo 60% acetonitrila/0,1% TFA e secos sob vácuo. Preparações de peptídeos sintéticos foram conseguidas através de cromatografia em fase reversa em HPLC.

4.3.2- Cromatografia líquida de alto desempenho

Após a purificação em cartuchos de Sep Pak C18, os peptídeos foram purificados em HPLC de fase reversa acoplado a uma coluna C-18. Os peptídeos foram eluídos em diferentes concentrações de acetonitrila em TFA 0,1% num fluxo de 1,0 mL/min e monitorados pela absorvância no comprimento de onda de 214 nm. Os picos de absorvância foram coletados, secos e analisados quanto à sua composição e pureza.

4.4- Oxidação do Ser¹-Ile¹⁶

A serina amino terminal do peptídeo foi oxidada a aldeído conforme Gaetner et al., 1992, com modificações. Em 5 mL de uma solução de peptídeo purificado 4 mg/mL em tampão imidazol 10 mM pH 6,0, foram adicionados 10 mg de NaIO₄ e em seguida a solução foi submetida a atmosfera de N₂ por 1h à temperatura ambiente. A reação foi parada com a adição de TFA 5%. O peptídeo foi obtido a partir de cromatografia em cartuchos Sep Pak C18 (item 4.3.1). A oxidação do peptídeo foi avaliada por análise de aminoácidos, na qual se verificou a redução em um resíduo de serina na composição do peptídeo. O peptídeo após oxidação da serina aminoterminal passou a ser denominado Ser¹-Ile¹⁵, uma vez que a serina aminoterminal foi convertida a aldeído.

4.5- Análise de aminoácidos do peptídeo sintetizado

Para a quantificação e determinação da pureza dos substratos sintetizados, foi feita a análise de aminoácidos.

4.5.1- Hidrólise ácida dos peptídeos

As amostras de peptídeos secos e livres de sal, previamente purificados em Sep Pak ou HPLC, foram hidrolisadas em 50 μ L de ácido metanossulfônico 4 N contendo 0,2% de triptamina a 115°C durante 20 h em microcapilares devidamente selados, de acordo com o método descrito por Liu e Boykins, 1989. Os hidrolisados foram retirados dos capilares, parcialmente neutralizados com 40 μ L de NaOH 4 N, diluídos em tampão citrato de sódio 0,2 M pH 2,2 contendo 15% (v/v) de glicerol e alíquotas de volume adequado foram cromatografadas segundo Spackman et al., 1958, modificado, em analisador de aminoácidos automático.

4.5.2- Determinação da composição de aminoácidos

A quantidade de cada aminoácido nas amostras foi determinada pela relação entre as alturas dos picos obtidos nas amostras dos hidrolisados e as alturas dos picos dos aminoácidos correspondentes (mesmo tempo de retenção pela coluna) num cromatograma obtido a partir de uma mistura padrão contendo 5 nmol de cada aminoácido. A composição em aminoácidos dos peptídeos foi calculada pela relação molar entre os resíduos encontrados nos hidrolisados.

4.6- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A Eletroforese foi desenvolvida segundo Laemmli (1970), utilizando-se o sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad). O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida 12% e o gel de concentração poliacrilamida 3%. A corrida foi feita sob amperagem constante de 15 mA, utilizando-se o tampão de corrida. O preparo das amostras para aplicação no gel deu-se da seguinte maneira: adicionou-se para 1 volume de amostra, 1 volume de tampão de amostra e em seguida ferveu-se por 4 min para desnaturação das proteínas em presença de DTT. A eletroforese foi realizada com aplicação de corrente constante de 15 mA. A coloração foi feita com Coomassie R-250. A composição dos géis e das soluções utilizadas na SDS-PAGE está detalhada no em materiasis item 3.6.

4.7- Síntese das resinas de afinidade

4.7.1- Sepharose-bisepoxi- ϵ -aminocapróico-p-amino-benzamidina

4.7.1.1- Ativação da Sepharose 6B por bisepóxi

Primeiramente, 20 mL de resina Sepharose 6B foram lavados com 300 mL de água destilada em funil de vidro de placa porosa sob vácuo. O excesso de água foi eliminado por sucção e transferiu-se a resina umedecida para um frasco contendo 15 mL de NaOH 1M contendo 30 mg de NaBH₄ e 5 mL de bisepóxi, deixando-a sob agitação à temperatura ambiente por 5 horas. A seguir, retornou-se a resina ativada por bisepóxi para o funil e foi lavada com 300 mL de água destilada. Testou-se a ativação da resina adicionando 1 mg de reagente de Ellman a uma alíquota de cerca de 100 μ L

da resina ativada, deixando por 5 min reagindo e lavando com água destilada em filtro de plástico. Foi adicionado 1mL de DTT 10% (p/v) em água destilada, agitou-se e o aparecimento de coloração amarelada na solução confirmou a ativação da resina. O teste também pode ser feito na resina tratada com DTT após sua lavagem, adicionando TNBS 0,1% em metanol, na presença de DIPEA 0,5 M à resina, verificando uma coloração avermelhada na resina. Confirmada a ativação da resina, esta pode ser estocada em NaCl 1M a 4°C por algumas semanas antes do seu uso.

4.7.1.2- Acoplamento do ácido ϵ -aminocaprício

Foram lavados 15 mL de resina ativada com bisepóxi (Seph-Bx) com 300 mL de água destilada. A resina umedecida foi transferida para um frasco contendo uma 15 mL de uma solução 1M de ácido ϵ -aminocaprício com pH entre 9,0 a 9,5 e deixada em banho a 37°C por 24 hs. A seguir, foi adicionado ao frasco, 100 μ L de β -mercaptoetanol, para bloqueio dos bisepóxi remanescentes, e deixou-se por 2h em banho a 37°C. A resina foi lavada com 300 mL de água destilada, seguido de 100 mL de NaCl 0,5M e 100 mL de NaCl 0,15 M, sendo estocada nessa solução a 4°C por algumas semanas antes do seu uso.

4.7.1.3- Acoplamento de p-amino-benzamidina

Foram lavados 5 mL de resina Seph-Bx- ϵ AC com 50 mL de NaCl 0,5M. Equilibrou-se essa resina em tampão MES 0,1M pH de 4,5 a 5,0 e ela foi transferida para um frasco contendo 5 mL de solução 0,1M de p-amino-benzamidina nesse mesmo tampão. Foi adicionado 0,3 g de EDAC e deixou-se sob agitação rotatória à temperatura ambiente por 15 a 24 h. A seguir, adicionou-se 0,5 mL de etanolamina 1M

pH 5,0, para bloqueio dos grupos carboxílicos remanescentes, deixando por 1 h sob agitação rotatória à temperatura ambiente. Após bloqueio, a resina foi lavada sequencialmente com 5 mL das seguintes soluções: e bicarbonato de sódio 0,5M, NaCl 0,5M, HCl 10 mM e NaCl 0,15M. A resina foi estocada a 4°C nessa última solução.

4.7.2-Sepharose-bisepoxi-εAC-hidrazida-Ser¹-Ile¹⁵

4.7.2.1-Acoplamento de hidrazina à resina Seph-Bx-εAC

Foram lavados 5 mL de resina Seph-Bx-εAC com 20 mL de NaCl 0,5M. Transferiu-se a resina umedecida para um frasco contendo 5 mL de solução hidrazina 17% em tampão MES 0,1 M com pH ajustado para 4,5 a 5,0. O pH da resina ressuspendida nessa solução estava em 4,7, sendo assim, foi adicionado 0,25g de EDAC e submeteu-se a agitação rotatória por 1 h à temperatura ambiente e durante a noite a 4°C em repouso. A seguir, a resina foi lavada seqüencialmente com 20 mL das seguintes soluções: tampão fosfato de sódio 0,1M pH 4,5, NaCl 0,5M, bicarbonato de sódio 0,1M e NaCl 0,15M. Testou-se o acoplamento da hidrazina em uma alíquota da resina adicionando TNBS 0,1% em metanol, na presença de DIPEA 0,5 M. O aparecimento de coloração violeta na resina confirmou o acoplamento e a formação de Seph-Bx-εAC-hidrazida. Esta resina foi estocada a 4°C em NaCl 0,15M.

4.7.2.2- Acoplamento de Ser¹-Ile¹⁵

Essa reação foi realizada conforme Geoghegan et al., 1992, com modificações. Foram condicionados em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,0, 3mL de resina Seph-Bx-εAC-hidrazida. A resina umedecida foi transferida para um frasco contendo 1 mL de

solução 10 mg/mL de peptídeo oxidado nesse mesmo tampão. Adicionou-se 50 µL de $MnCl_2$ (1:20 v/v), agitou-se por 2 h à temperatura ambiente e deixou-se a 4°C durante a noite em repouso. A seguir, o sobrenadante e o lavado foram recolhidos e avaliou-se o conteúdo peptídico por análise de aminoácidos. Verificou-se que 5 mg de peptídeo oxidado havia se ligado aos 3mL de resina hidrazida. A resina Seph-Bx-εAC-hidrazida-Ser¹-Ile¹⁵ foi estocada em NaCl 0,15 M a 4°C até o seu uso.

4.7.3- Sepharose-IBPA-Suc-NHS-BApNA-hidrolase

4.7.3.1- Ativação de sepharose por CDI

Primeiramente, 20 mL de resina Sepharose 6B foram lavados com 200 mL de água destilada em uma coluna, por gravidade. A seguir, foram feitas lavagens sucessivas com acetona nas seguintes concentrações: 25, 50, 75 e 100% com 40 mL cada e depois a mesma quantidade de acetona anidro. Transferir para um frasco de plástico e adicionar 10 mL do mesmo solvente anidro contendo 0,5 g de CDI, deixando sob agitação por 20 min a temperatura ambiente. Após este período, a resina foi lavada com acetona comum, no sentido inverso, isto é, de 100% até água.

4.7.3.2- Acoplamento de IBPA à Sepharose ativada

Foram transferidos os 20 mL de resina ativada por CDI para um funil de placa porosa e lavadas com 200 mL de bicarbonato de sódio 0,5 M. Imediatamente a resina umedecida foi transferida para um frasco de plástico contendo 20 mL de uma solução 0,1 M de IBPA e deixada sob agitação por 2 h e em repouso durante a noite a 4°C.

Após esse tempo, adicionar 500 μ L de etanolamina 0,1 M pH 9,0 e deixar a 4°C por 2 h. Lavar a resina com 200 mL de bicarbonato de sódio 0,1 M em seguida salina 0,15 M.

4.7.3.3- Succinilação de Seph-IBPA

Um excesso molar de 15 vezes de anidrido succínico com relação ao número de moles de grupamentos amino adicionado foi pesado e adicionado lentamente à resina, cujo pH foi constantemente monitorado por pHmetro. O pH da mistura foi mantido próximo do valor de pKa do grupo amino (8-9) pela adição concomitante ao anidrido, de solução de NaOH 5M. A succinilação foi acompanhada por reação de alíquotas da resina após adições de anidrido, com TNBS na presença de DIPEA. A ausência de coloração da resina após esse teste indicou o final da reação de succinilação. Em seguida, a resina foi lavada com NaCl 0,15 M e estocada a 4°C até seu uso.

4.7.3.4- Ativação de Seph-IBPA-Suc por NHS

Foram lavados 20 mL da resina Seph-IBPA-Suc com 200 mL de HCl 0,1 M em funil de placa porosa. A seguir a resina foi transferida para meio orgânico através de passagens sucessivas de 60 mL de dioxano nas concentrações de 25 %, 50 %, 75 % e 100 %. Após a remoção do excesso de dioxano a resina foi transferida para frasco de plástico contendo 20 mL de solução de NHS 10 mg/mL e submetida a agitação por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, a resina foi lavada com mesmo volume de dioxano nas concentrações de 75 %, 50 %, 25 % e HCl 1 mM. Para estoque, a resina foi equilibrada em isopropano anidro e deixada a 4°C.

4.7.3.5- Acoplamento da BApNA-hidrolase purificada de veneno de *C.durissus*

Em 2 mL de uma solução de proteína 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,1 pH 8,0, foram adicionados 2 mL da resina Seph-IBPA-Suc-NHS- umedecida e equilibrada nesse mesmo tampão e deixada por 24 h a 4°C. Após acoplamento a resina foi incubada com 100 µL de etanolamina 0,1 M pH 9,0 por 2 h à 4°C. A seguir a resina foi lavada com 10 mL de bicarbonato de sódio 0,1 M, seguida pelas seguintes soluções: salina 0,15 M, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0, glicina 0,1 M pH 2,8 e novamente em salina 0,15 M para estocar a 4°C.

4.7.4- Suporte de vidro de poro controlado-diAP-Abu-Met-Ile¹⁵-Ser¹

Condicionou-se 600 mg de suporte de vidro de poro controlado (Vid) em dioxano anidro por 15 min e transferiu-se a resina para um reator de vidro acoplado a um sistema semi-automático de síntese química de peptídeo. À resina seca, foi adicionado 3 mL de solução de CDI (120 mg/mL) e deixou-se por 30 min sobre agitação. Seguiu-se com 7 ciclos de lavagem com dioxano anidro. À resina seca, adicionou-se 2,4 mL de solução de 1,3-diaminopropano (diAP) (40% v/v) em dioxano dando 6 pulsos de 60s em microondas na potência 10 % (80W). A resina foi submetida a 7 ciclos de lavagem com dioxano e testou-se acoplamento de amina com TNBS na presença de DIPEA. Confirmado o acoplamento da diamina procedeu-se à síntese do peptídeo Ile¹⁵-Ser¹ em fase sólida conforme 4.2. O esquema final da estrutura da resina foi o seguinte: Vid-diAP-Abu-Met-Ile-Pro-Pro-Ser-Ser-Pro-Leu-Ser-Leu-Pro-Ala-Ile-His-Glu-Ser, a qual passou a ser denominada Vid-Ile¹⁵-Ser¹.

4.8- Obtenção do conjugado Ser¹-Ile¹⁵ : carreador protéico

4.8.1- Produção do carreador protéico

A crotamina, uma proteína de 5 kDa muito abundante em venenos crotálicos, foi utilizada como o carreador protéico do peptídeo sintetizado para imunização dos coelhos após as modificações químicas descritas abaixo:

4.8.1.1- Redução

A crotamina apresenta em sua estrutura primária seis resíduos de cisteína envolvidos em pontes dissulfeto e a redução dessas ligações exporiam grupamentos SH reativos nessa proteína. A redução se deu da seguinte forma:

- 45 mg de crotamina purificada e liofilizada foram ressuspensas em 3 mL de cloreto de guanidino 7M. Em seguida, adicionou-se 300 µL de Tris-HCl 1M pH 8,1, 30 µL de EDTA 100 mM e 46 mg de DTT. Essa mistura foi mantida sob agitação por 2 h à 37°C.

4.8.1.2- Carboximetilação

Os grupamentos SH das cisteínas livres serão bloqueados por iodo-acético e passarão a exibir grupamentos carboxílicos. A carboximetilação se deu da seguinte forma:

- A mistura foi isolada da luz e adicionaram-se 127 mg de iodo acético e 83 mg de Tris. O pH da reação foi acompanhado em pHmetro devendo ser mantido próximo ao pKa dos grupamentos SH livres (8,8-9,0). À medida que o pH reduzia adicionou-se Tris para neutralizá-lo, totalizando uma quantidade de 170 mg de Tris adicionados no total. A carboximetilação dos SH foi acompanhada pela reação de uma alíquota da proteína com o reagente de Ellman, o qual reage com

SH livre tornando a solução amarelada. A ausência de coloração da proteína após esse teste indicou o final da reação de carboximetilação. A análise de aminoácidos dessa proteína também confirmou essa reação, revelando a formação do resíduo de carboximetilcisteína e o desaparecimento dos resíduos de cisteína. Em seguida a mistura foi dialisada a 4°C contra água destilada em membrana cut-off 3000 Da para remoção dos reagentes utilizados.

4.8.1.3- Succinilação

A crotamina contém 9 resíduos de lisina, os quais contém aminos livres em seus radicais. Estes grupamentos serão succinilados e passarão a grupamentos carboxílicos.

A succinilação se deu da seguinte forma:

- Um excesso molar de 15 vezes de anidrido succínico com relação ao número de moles de grupamentos amino, foi pesado (150 mg) e adicionado lentamente no material dialisado, que cujo pH foi constantemente monitorado pelo pHmetro. O pH da mistura foi mantido próximo do valor de pKa do grupo amino (8-9) pela adição concomitante ao anidrido, de solução de NaOH 5M. A succinilação foi acompanhada por reação de alíquotas da proteína, após adições de anidrido, com TNBS na presença de DIPEA. A ausência de coloração da proteína após esse teste indicou o final da reação de succinilação. Em seguida a mistura foi dialisada conforme item anterior e liofilizada.

4.8.1.4- Hidrazidação

Até o momento, a proteína contém 17 grupos carboxílicos livres; 6 provenientes dos resíduos de cisteína, 9 dos resíduos de lisina, 1 de um ácido aspártico e 1 carboxi-

terminal. A reação desses grupos com hidrazina levará a formação de hidrazida, um grupamento que reage diretamente com aldeídos formando hidrazonas por uma ligação estável em pH não muito baixo. A hidrazidação se deu da seguinte forma:

- 20 mg do material liofilizado foi ressuspenso em 5 mL de hidrazina 17% em tampão MES 0,1M pH 5,0. Adicionou-se 125 mg de EDAC à solução e a reação foi mantida durante a noite a 4°C. O material foi dialisado conforme item acima e liofilizado. A presença de coloração violeta após teste com TNBS/DIPEA confirmou a reação de hidrazidação.

4.8.2- Obtenção do conjugado

O acoplamento se deu fazendo uso de um excesso molar de 5x de Ser¹-Ile¹⁵ com relação ao carreador. O acoplamento foi confirmado por análise de HPLC, SDS-PAGE e análise de aminoácidos, a qual mostrou um acoplamento de cinco Ser¹-Ile¹⁵ por molécula de carreador.

4.9- Obtenção de anticorpos

4.9.1- Anticorpos de coelho

4.9.1.1- Imunização de coelhos para obtenção de anticorpos anti- Ser¹-Ile¹⁵

Foram utilizados 2 coelhos adultos jovens para produção de anticorpos anti-Ser¹-Ile¹⁵. Os animais foram imunizados através do uso do adjuvante de Freund, como descrito por Herbert (1978), utilizando-se 300 µg de conjugado em cada inoculação por via subcutânea, como segue: 1^a inoculação em adjuvante completo de Freund; 2^a inoculação, após duas semanas, em adjuvante incompleto de Freund; 3^a inoculação,

após duas semanas. Uma semana após a última inoculação coletou-se o sangue dos animais por punção cardíaca e o soro foi obtido depois de 12 h de coagulação a 4°C. A seguir, os soros foram centrifugados a 4°C/5000 rpm e os sobrenadantes foram utilizados para posteriores ensaios imunológicos.

4.9.1.2- Anticorpos de cavalo

Os anticorpos antibotrópico e anticrotálico utilizados nesse estudo foram obtidos a partir de ampolas comerciais para uso humano produzidas pelo Instituto Butantan/SP.

4.10- Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade

As resinas utilizadas para purificação dos anticorpos foram: Seph-Bx-εAC-Ser¹-Ile¹⁵-COONH₂ (3mL), Seph-IBPA-Suc-NHS-BApNA-hidrolase (2mL) e Suporte de vidro de poro controlado-IBPA-Abu-Met-Ile¹⁵-Ser¹ (0,5mL), todas empacotadas em colunas de plástico contendo filtros nas porções superior e inferior. O fluxo nessas cromatografias foi de 0,3 mL/min e o procedimento descrito abaixo foi o mesmo para cromatografias de afinidade dos soros de coelho e cavalo realizadas nesses três tipos de resina. O soro foi inicialmente dialisado contra o tampão Tris-HCl 100 mM com 100 mM de NaCl, utilizado como tampão de equilíbrio nessas cromatografias. Após aplicação do dialisado, a coluna foi lavada sequencialmente com 4 volumes do tampão de equilíbrio e NaCl 0,15 M. A eluição foi feita com glicina 0,1 M pH 2,8, coletando-se frações de 250 µL em tubos contendo 60 µL de Tris-HCl 1M pH 8,1, para imediata neutralização do pH.

4.11- Immunoblotting

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seco. Após o fracionamento das proteínas, o gel foi incubado no tampão de transferência por 5 min. Depois foi montado o sistema para transferência: primeiro cinco pedaços de papel de filtro, por cima a membrana de nitrocelulose, depois o gel previamente equilibrado no tampão de transferência, e finalmente mais cinco pedaços de papel de filtro. Os papéis de filtro e a membrana de nitrocelulose foram previamente umedecidos no tampão de transferência. A transferência foi realizada sob voltagem constante de 10 V por 25 min. Ao término da transferência, a membrana foi bloqueada por 2 h em temperatura ambiente com TTBS contendo 10% (p/v) de leite desnatado em pó. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes de 5 min cada com TTBS, e depois incubada em sacos plásticos selados com cada anticorpo com suas respectivas diluições em TTBS contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado durante a noite a 4°C sob agitação. Após a lavagem com TTBS, a membrana foi incubada por 1h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou cavalo, conjugado à peroxidase, diluído 1:2000 e 1:500, respectivamente, em TTBS contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado. Depois de lavar a membrana por 3 vezes com TTBS, foi feita a revelação por quimioluminescência. Para a revelação, a membrana foi incubada por 1 min em temperatura ambiente com a mistura das soluções A e B, v/v. Depois foi feita a exposição da membrana ao filme por 1 min ou 5 min e o filme revelado através da incubação na solução reveladora e em seguida fixado na solução fixadora (item 3.11 de materiais). O filme foi então lavado com água e deixado secar.

5- RESULTADOS

5- RESULTADOS

PARTE I: PURIFICAÇÃO DE BApNA-HIDROLASE DE VENENO CROTÁLICO

5.1- Purificação da enzima coagulante do veneno de *C. durissus*

A obtenção da enzima coagulante, ou giroxina, do veneno de *C. durissus*, foi conseguida isolando-se as frações com atividade hidrolítica sobre o substrato BApNA das cromatografias mostradas a seguir. Entre as BApNA-hidrolases do veneno de *C. durissus*, a enzima coagulante caracteriza-se por coagular uma solução de fibrinogênio e hidrolisar ésteres e amidas de arginina na posição C-terminal de substratos peptídicos sintéticos; outras peptidases do veneno agem preferencialmente sobre os ésteres de arginina (Alexander et al., 1988).

O passo inicial da purificação da enzima coagulante consistiu na remoção do principal componente do veneno crotálico, a crotoxina, por precipitação isoelétrica em pH 4,7; este procedimento utilizado foi uma modificação daquele descrito por Slotta e Frankael-Conrat (1938) para obtenção da crotoxina. Como indicado na Figura 1A, a atividade hidrolítica sobre o BApNA foi recuperada associada a dois picos de proteína (P2 e P3) na cromatofocalização do sobrenadante obtido por precipitação isoelétrica do veneno. As frações destes dois picos também continham atividade esterolítica sobre o BAEE, com a razão $(A_{410}/\text{min}/\mu\text{L}) / (A_{253}/\text{min}/\mu\text{L})$ de ambos picos sobre os substratos BApNA e BAEE de 0,6 para P1 e 0,15 para P2, indicando que a enzima coagulante deveria estar em P2. As quatro frações mais ativas de P2 foram reunidas e recromatografadas nas mesmas condições anteriores, cujo resultado está mostrado na Figura 1B; a atividade hidrolítica sobre o BApNA distribuiu-se em dois picos com largura

total praticamente idêntica à de P2, Figura 1A, superpondo-se os picos de atividade sobre BAEE e de proteína. Esse resultado é sugestivo da existência de pelo menos duas isoformas da enzima coagulante de *C.durissus*, possivelmente dependentes do grau de glicosilação. Esta hipótese foi testada por tratamento das proteínas eluídas ao longo destes dois picos com PGNase F e análise eletroforética dos produtos, confirmando que as formas deglicosiladas destas proteínas são idênticas e de tamanho compatível com o da enzima coagulante (Figura 2). Nesta etapa de purificação a preparação ainda mostrava contaminantes de 13 kDa ou menos, que foram removidos por cromatografia de afinidade em resina Seph-Bx-εAc-benzamidina, que reteve seletivamente a BApNA-hidrolase coagulante do veneno (Figura 3). O alto grau de purificação da enzima foi mostrado pela banda única visualizada após SDS-PAGE corado com coomassie blue (Figura 4). Esta preparação da enzima coagulante foi utilizada nos experimentos de imunquímica ao longo do nosso trabalho.

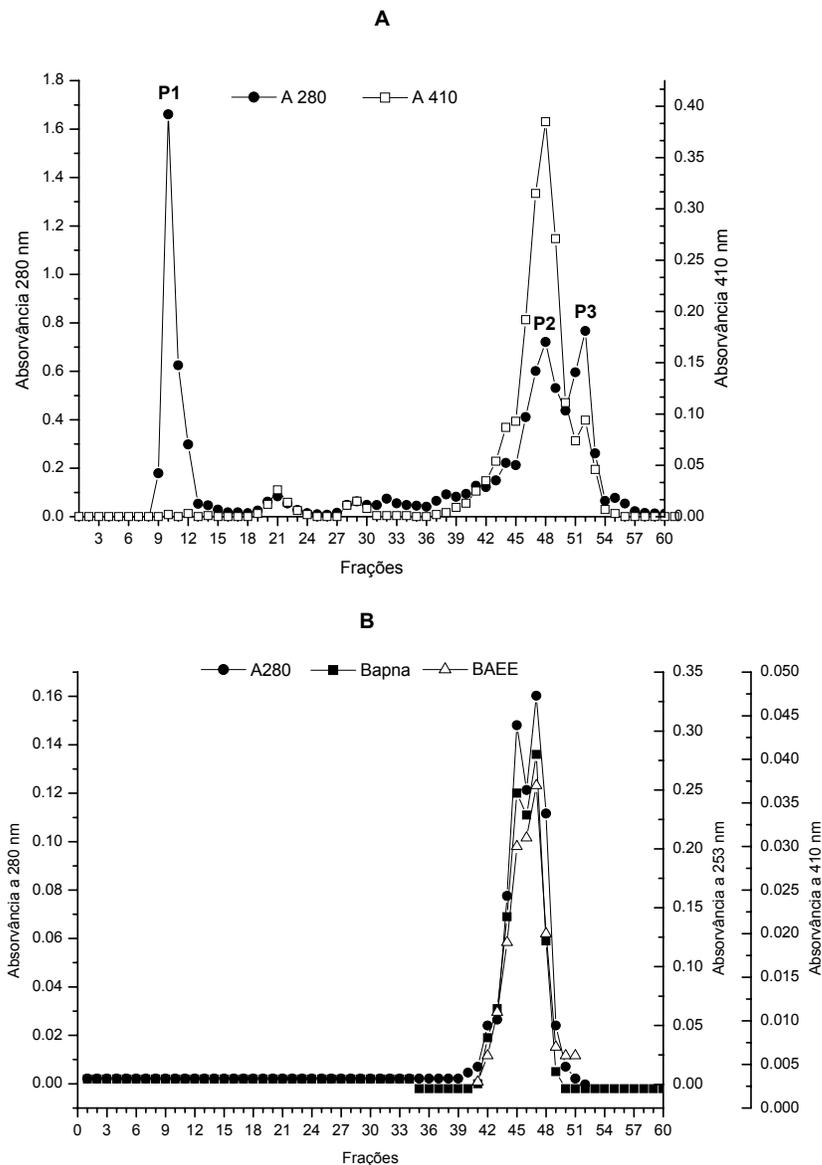


Figura 1- Cromatofocalização do sobrenadante da precipitação isoeétrica de veneno crotálico em resina CM-Sepharose. A resina foi equilibrada em acetato de amônio 20 mM pH 4,5. Foi utilizado para eluição o tampão Polibuffer94 1:10 (v/v) pH 7,2 ao fluxo de 40 μ L/min coletando-se frações de 1 mL. Foram utilizadas como amostra: sobrenadante proveniente da precipitação isoeétrica (A) e as frações F46 a F49 provenientes de A (B). As atividades enzimáticas foram avaliadas por absorvância a 410 nm e 253 nm dos produtos formados respectivamente para BApNA e BAEE. A absorvância a 280 nm foi utilizada para identificação das proteínas na fase móvel.

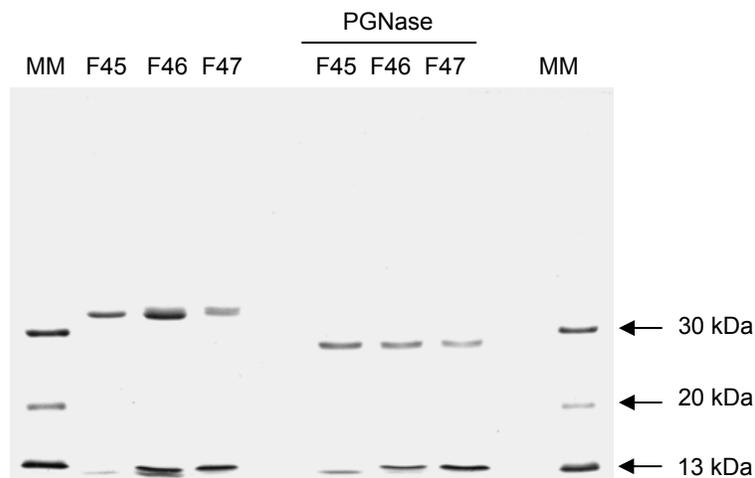


Figura 2- Avaliação por SDS-PAGE dos produtos da deglicosilação das BApNA-hidrolases por PGNase F. SDS-PAGE 12 % das frações 45 (F45), 46 (F46) e 47 (F47) provenientes da recromatofocalização tratadas e não tratadas com a enzima PGNase F. MM corresponde ao padrão de massa molecular utilizado.

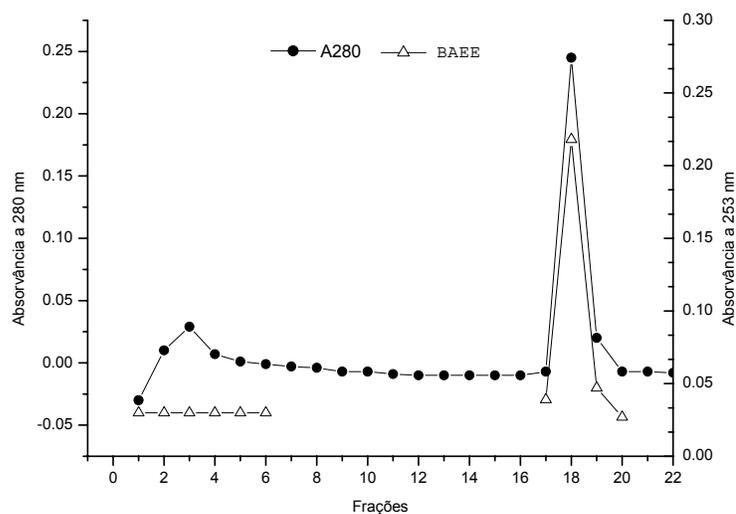


Figura 3- Cromatografia de afinidade em resina Sepharose-benzamidina das frações recromatofocalizadas. A coluna foi equilibrada em Tris-HCl 0,1 M com 0,1 M de NaCl. Foram feitos dois passos de eluição, o primeiro com acetato de sódio 50 mM pH 4,75 com NaCl 0,1 M até a fração 20 seguido por formato de sódio 50 mM pH 3,0 com 0,1 M de NaCl. Frações de 400 μ L eluídas foram coletadas em tubos contendo 60 μ L de Tris-HCl 1 M pH 8,1.

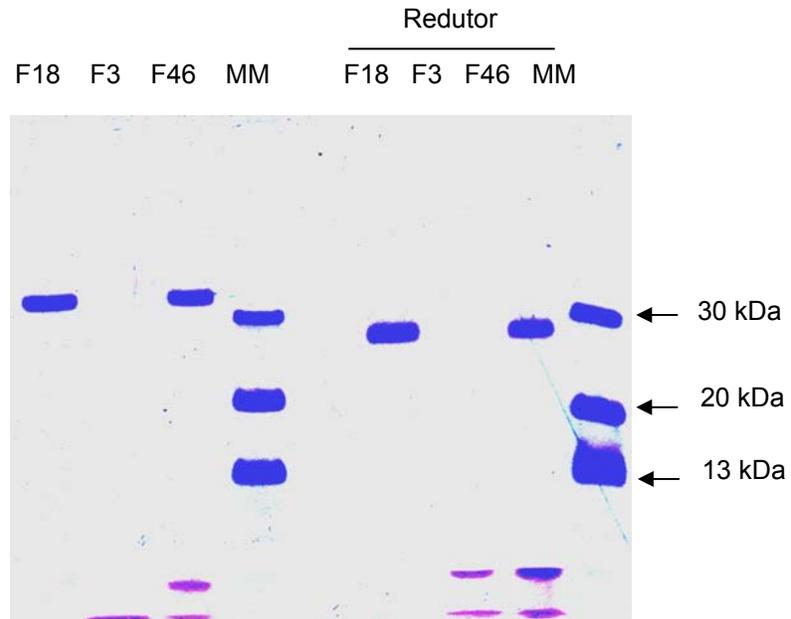


Figura 4- Análise por SDS-PAGE das frações provenientes da cromatografia de afinidade e recromatofocalização. SDS-PAGE 12 % das frações 3 (F3) e 18 (F18) provenientes da cromatografia de afinidade e da fração 46 (F46) obtida da recromatofocalização tratadas e não tratadas com DTT. MM corresponde ao padrão de massa molecular utilizado.

PARTE II: PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Ser¹-Ile¹⁵

5.2- Escolha do peptídeo para imunização

A estrutura primária da proteína giroxina de *C.durissus* (gi:61741494), uma BApNA-hidrolase, foi alinhada ao ativador de plasminogênio de *Trimeresurus stejnejeri* TSV-PA (gi:5821881), mostrando uma identidade de 60 %, com 1 % de gap e 70 % de resíduos positivos (propriedades físicas e/ou químicas semelhantes) (Figura 5). As seqüências de aminoácidos das regiões de alça externa dessa proteína foram localizadas através do programa Cn3D na estrutura tridimensional cristalografada de TSV-PA (número de acesso: 1BQY) (Figura 6).

Gir 1	VIGGDECNINERNFLVALYEYWSQSFLCGGTLINGEWVLTAAHCDRKHILIIYVGVHDRSV	60
	V GGDECNINE LV L+ S FLCGGTLIN +WV+TAAHCD + + GVH + +	
TSV 1	<u>VFGGDECNINEHR</u> SLVVLFN--SNGFLCGGTLINQDWVVTAA <u>AHCDSNNF</u> QLLFG <u>VHSKKI</u>	58
	Alça 1 Alça 2 Alça 3	
Gir 61	QFDKEQRRFPKEKYFFNCRNNFTKWDKDIMLIRLNKPVSYSEHIAPLSLSPSSPPIVGSVC	120
	+ EQ R PKEK+F R + DKDIMLI+L+ VS SEHIAPLSLSPSSPP VGSVC	
TSV 59	<u>LNED</u> EQTRDPKEKFF <u>CPNRKKDDEV</u> DKDIMLIKLD <u>DSSVSNSEHIAPLSLSPSSPPSVGSVC</u>	118
	Alça 4 Alça 5	
Gir 121	RVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYGVCRTAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
	R+MGWG +E PDVPHCANIN+LD+ VCRTA+ ++ T+ LCAG+L+GG DTC	
TSV 119	RIMGW <u>GKTIPTKEIYP</u> DVPHCANINILDHAVCRTAYS <u>WRQVAN</u> TT--LCAGILQGG <u>RDTC</u>	176
	Alça 6 Alça 7 Alça 8	
Gir 181	HRDSGGPLICNGEFQGIIVSWGDSQAPDKPALYSKVFDHLDWIIQNIAGSETVNC	237
	H DSGGPLICNG FQGIIVSWG C QP +P +Y+KVFD+LDWI++IIAG++ CP	
TSV 177	<u>HFDS</u> GGPLICNGIFQGIIVSWG <u>GGHPC</u> GQPGEPGVYTK <u>VFDY</u> LDWIKSIIAG <u>GNKDATCP</u>	233
	Alça 9 Alça 10 Alça 11	

(+) resíduos com mesmas características físico-químicas

Figura 5- Alinhamento de seqüências das proteínas giroxina e TSV-PA utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) para duas seqüências. As regiões em negrito correspondem às alças externas da proteína TSV-PA.

Aliando-se os critérios de exposição da alça ao exterior (Figura 6) e identidade de seqüência entre giroxina e TSV-PA, a região correspondente a alça 5 foi escolhida para o desenho do peptídeo.

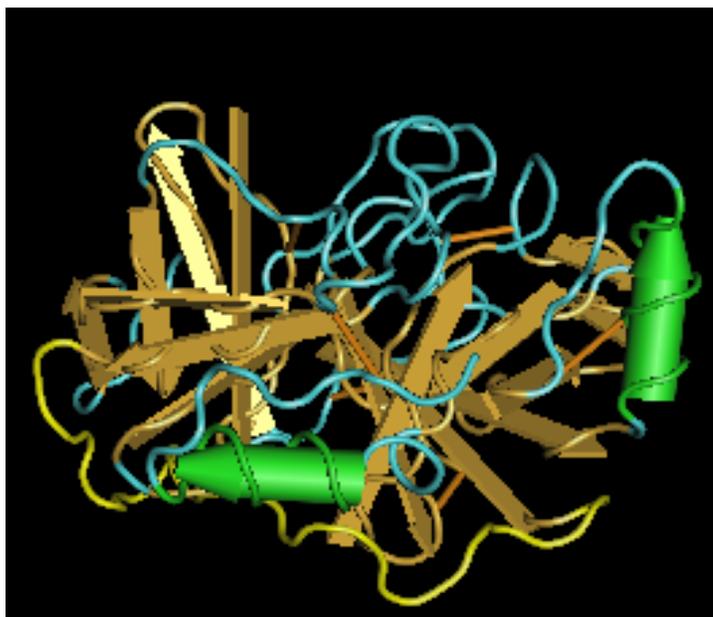


Figura 6- Estrutura tridimensional da proteína TSV-PA demonstrada pelo programa Cn3D. As regiões em verde correspondem a alfa-hélices; em dourado, folhas β ; em azul, alças; em amarelo a alça 5.

A seqüência do peptídeo escolhido foi: **SSEHIAPLSLPSSPPI**, a qual estava contida completamente dentro da alça 5 (Figura 7). Foi adicionada à seqüência escolhida uma serina na porção amino terminal para servir de ponto de acoplamento ao carreador ou fase sólida após oxidação com periodato de sódio.

```

Gir 61  QFDKEQRRFPKEKYFFNCRNNFTKWDKDIMLIRLNKPVSYSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC 120
      + EQ R PKEK+F R + DKDIMLI+L+ VS SEHIAPLSLPSSPP VGSVC
TSV 59  LNEDEQTRDPKEKFFCPNRKKDDEVDDKDIMLIKLDSSVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVC 118
                                     Alça 5

```

Figura 7- Identificação do peptídeo sintetizado na seqüência da giroxina. Alinhamento de seqüências das proteínas giroxina e TSV-PA utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) para duas seqüências, destacando em vermelho a Alça 5 e em azul a seqüência do peptídeo escolhido.

5.3- Síntese do conjugado (Ser¹-Ile¹⁵: carreador protéico)

O produto da síntese química do Ser¹-Ile¹⁶, obtido após a clivagem da resina, foi analisado por cromatografia de fase reversa em HPLC. O material correspondente ao pico majoritário obtido na cromatografia (Figura 8A), eluído a 22 % de acetonitrila, foi submetido à análise de aminoácidos que confirmou a composição aminoacídica do peptídeo (Ser 4,4; Glu 1; Pro 4; Ala 1,1; Leu 2,1; Ile 2,1; His 1,1). Antes de ser submetido à oxidação, Ser¹-Ile¹⁶ foi purificado e obteve-se um único pico no cromatograma (Figura 8B).

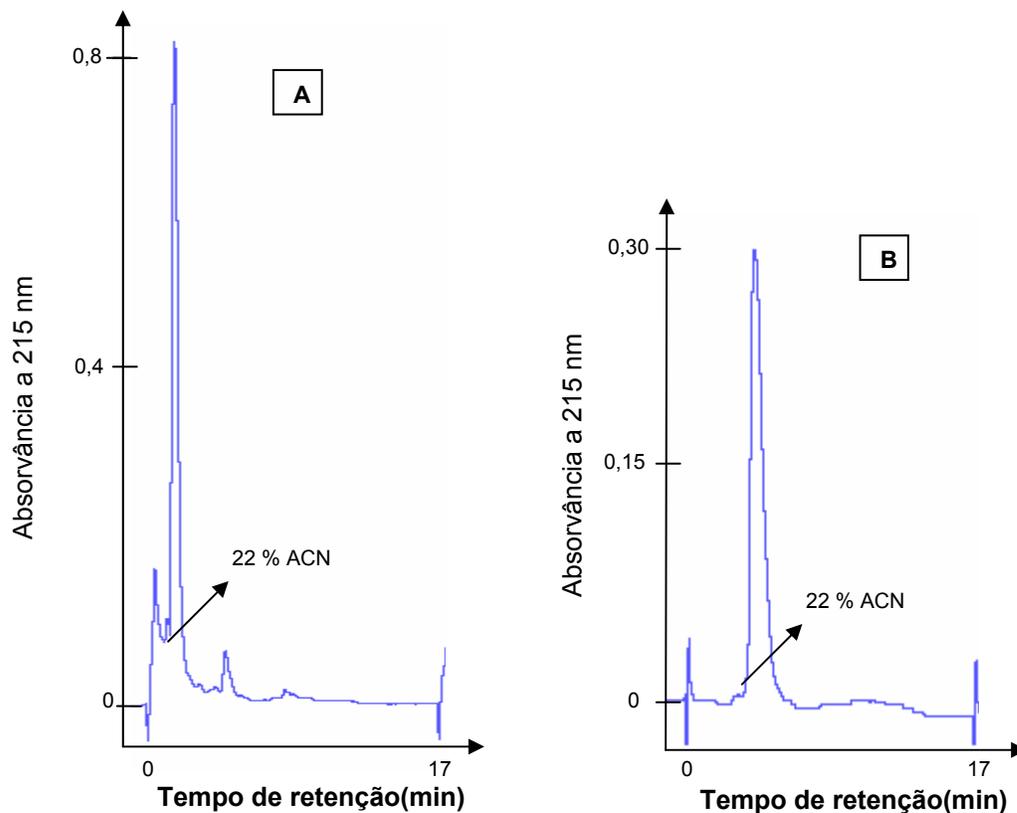


Figura 8- Perfis de HPLC fase reversa C-18 do hexadecapeptídeo sintético Ser¹-Ile¹⁶. As amostras (**A**- peptídeo bruto e **B**- peptídeo purificado) foram aplicadas em solução A (ACN 5 % / TFA 0,1 %) à coluna C-18 (0,46x15cm) e eluídas com um gradiente linear de 21 a 27 % de ACN em TFA 0,1% em **A**, e de 18 a 27 % de ACN em TFA 0,1 % em **B**, num fluxo de 1ml/min. A detecção dos peptídeos foi realizada por A_{215nm}.

O processo de oxidação da serina amino terminal do peptídeo para formação de um grupamento aldeídico nesta extremidade foi confirmado por análise de aminoácidos e por cromatografia de fase reversa em HPLC (Figura 9), na qual se verificou um maior tempo de retenção da forma oxidada do peptídeo (**C**- Ser¹-Ile¹⁵) em comparação a não oxidada (**B**- Ser¹-Ile¹⁶). A análise de aminoácidos dos picos P1 e P2 de **A** mostrou uma redução de um resíduo de serina na composição aminoacídica em Ser¹-Ile¹⁶, comprovando a alteração deste resíduo após a reação de oxidação (Ser 3,4; Glu 1; Pro 3,6; Ala 1,1; Leu 2,1; Ile 2,1; His 1,1). Assim, obteve-se o peptídeo na forma oxidada para as reações de acoplamento à resina e ao carreador protéico.

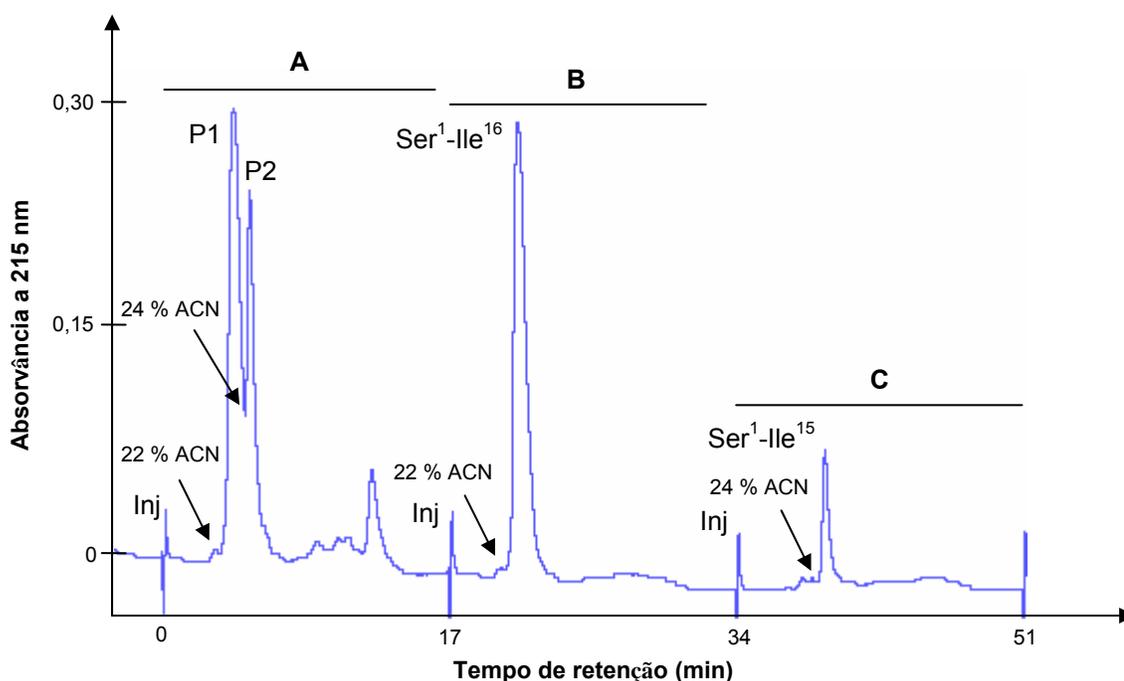


Figura 9- Perfis de HPLC fase reversa C-18 da oxidação do hexadecapeptídeo sintético Ser¹-Ile¹⁶. As amostras (**A**- peptídeo Ser¹-Ile¹⁵ e Ser¹-Ile¹⁶, **B**- peptídeo Ser¹-Ile¹⁶ purificado, e **C**- peptídeo Ser¹-Ile¹⁵) foram aplicadas em solução A (ACN 5 % / TFA 0,1 %) em coluna C-18 (0,46x15cm) e eluídas com um gradiente linear de 18 a 27 % de ACN em TFA 0,1 %, num fluxo de 1ml/min. A detecção dos peptídeos foi realizada por A_{215nm}. Inj- injeção.

O carreador usado neste trabalho foi produzido a partir da crotamina, uma proteína de 5 kDa disponível em alto grau de pureza. Essa proteína crotamina foi submetida a reações de redução, carboximetilação, succinilação e hidrazidação, para posterior acoplamento do peptídeo oxidado com subsequente formação do conjugado para a imunização. A carboximetilação dos resíduos de cisteína foi confirmada por análise de aminoácidos que mostrou a total conversão dos seus resíduos de cisteína em carboximetil-cisteína (Figura 10).

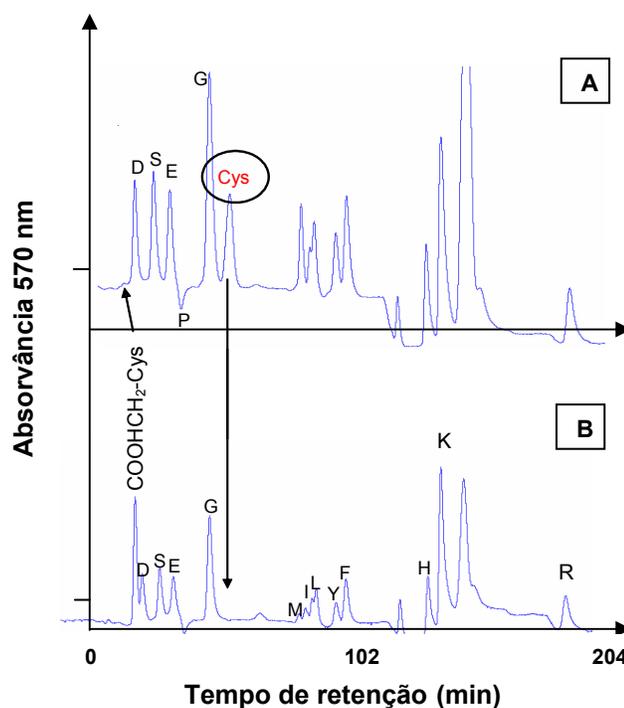


Figura 10- Análise de aminoácidos da crotamina após redução e carboximetilação. (A) Crotamina; (B) Crotamina reduzida e carboximetilada. As amostras foram hidrolisadas com ácido metanossulfônico e aplicadas em analisador de aminoácido automático equipado com coluna de resina Beckman W-3 (22x0,6 cm).

As demais reações foram confirmadas por teste colorimétrico utilizando TNBS/DIPEA, verificando ausência de coloração após a succinilação e o aparecimento de coloração violeta na amostra após a hidrazidação. Houve polimerização de cadeias

polipeptídicas após essas reações, havendo a predominância da forma monomérica, conforme se verificou na análise por SDS-PAGE do produto formado (Figura 11).

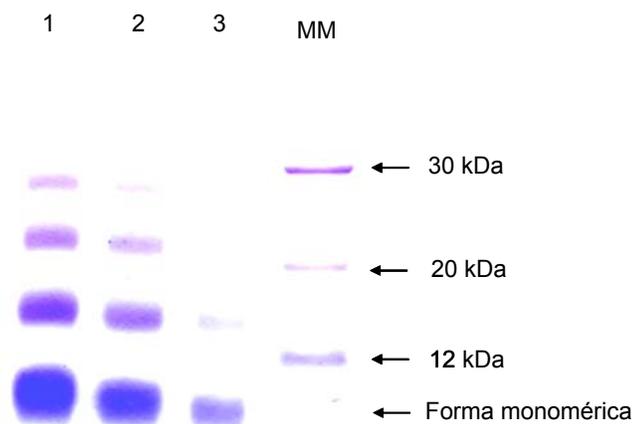


Figura 11- SDS-PAGE 12 % do carreador protéico formado a partir da crotamina. Foram aplicadas 36, 18 e 9 µg do carreador protéico respectivamente nas canaletas 1, 2 e 3. MM corresponde ao padrão de massa molecular utilizado.

Ao carreador protéico formado, adicionou-se um excesso do peptídeo Ser¹-Ile¹⁵ para a formação do conjugado. A avaliação do acoplamento de Ser¹-Ile¹⁵ ao carreador protéico se deu através de cromatografia de fase reversa em HPLC, análise de aminoácidos e SDS-PAGE. O perfil cromatográfico do carreador foi completamente alterado após a adição do peptídeo, conforme se verificou nos cromatogramas obtidos (Figura 12). Através de análise de aminoácidos da cromatografia do conjugado (Figura 12B) (dados não mostrados), o Pico I foi identificado como sendo Ser¹-Ile¹⁵ livre e o Pico II correspondeu a uma molécula carreadora contendo cinco peptídeos acoplados. A identificação desse conjugado como sendo pentavalente se deu pela razão entre o número de nmoles de alanina (um aminoácido ausente no carreador e presente unitariamente na composição do peptídeo) pelo número de nmoles de tirosina (ausente

no peptídeo e presente unitariamente na composição do carreador). Desta forma, verificou-se que havia uma proporção molar de 5:1 no complexo peptídeo:carreador.

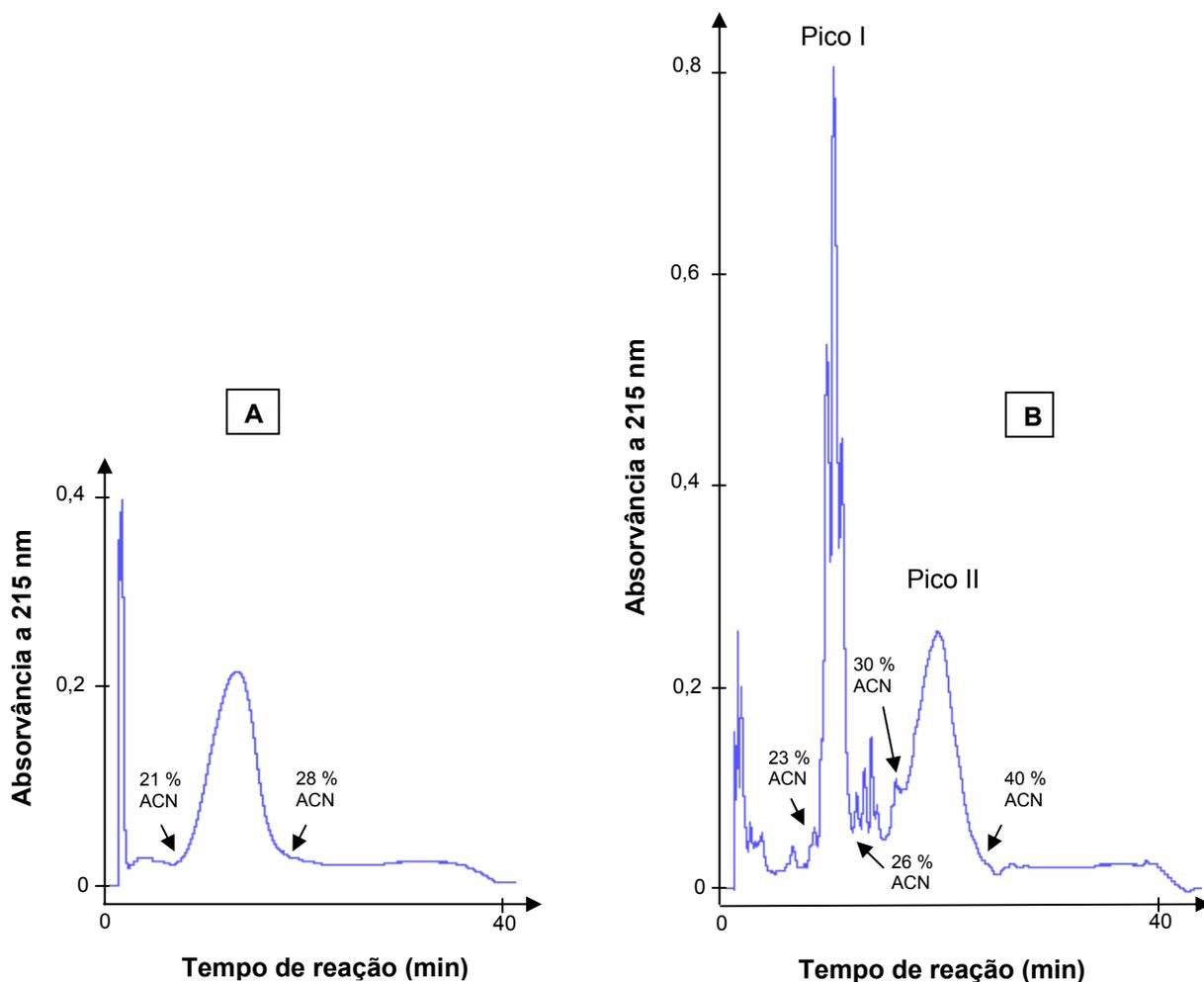


Figura 12- Perfis de HPLC fase reversa C-18 do acoplamento do peptídeo Ser¹-Ile¹⁵ ao carreador protéico. As amostras (**A**- carreador protéico e **B**- conjugado) foram aplicadas em solução A (ACN 5 % / TFA 0,1 %) em coluna C-18 (0,46x15cm) e eluídas com um gradiente linear de 15 a 48 % de ACN em TFA 0,1%. A detecção dos peptídeos foi realizada por A_{215nm}.

Uma análise por SDS-PAGE do conjugado mostrou um arraste protéico com mobilidade eletroforética diferente das observadas nos polímeros formados pelo carreador apenas (Figura 13), sugerindo a existência de conjugado com múltiplos graus de derivatização, com valor médio de 5:1 peptídeo: carreador.

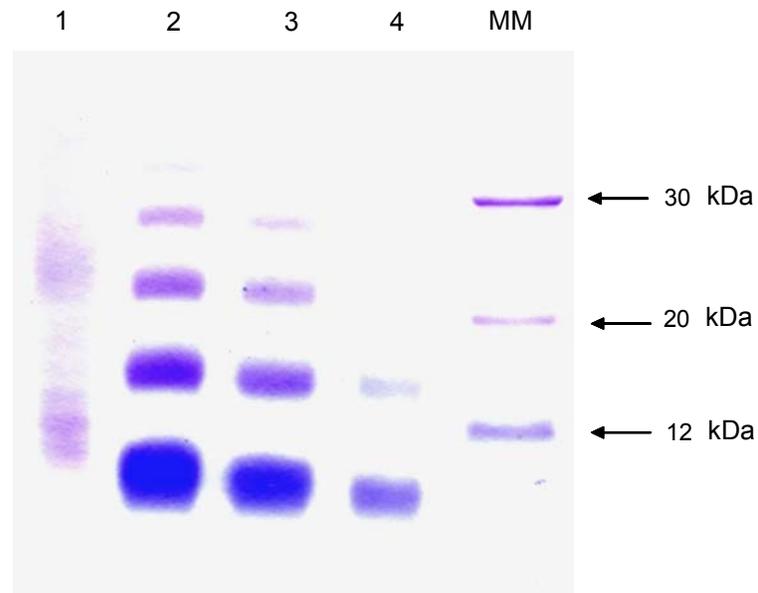


Figura 13- Análise por SDS-PAGE 12 % do conjugado e do carreador protéico formado. As amostras aplicadas foram: na canaleta 1, 5 μg do conjugado; nas canaletas 2, 3 e 4, quantidades de 36, 18 e 9 μg do carreador protéico respectivamente. MM corresponde ao padrão de massa molecular utilizado.

O conjugado produzido foi utilizado para imunização de dois coelhos para obtenção do soro anti-Ser¹-Ile¹⁵.

PARTE III: ANÁLISE IMUNOQUÍMICA DE VENENOS UTILIZANDO ANTICORPOS ANTI-Ser¹-Ile¹⁵

5.4- Caracterização dos anticorpos

A caracterização dos anticorpos de coelho e de cavalo se deu através de immunoblotting fazendo uso da reação da peroxidase com substrato para ensaio quimioluminescente (ECL) para revelação dos anticorpos primários. Como antígenos para avaliar a imunorreatividade cruzada de anticorpos de diferentes especificidades contra venenos de diferentes espécies foram utilizados venenos das seguintes espécies: *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwidi* e *Lachesis muta*, em todos os experimentos para análise da imunorreatividade cruzada.

5.4.1- Avaliação da produção e especificidade de soros de coelho anti-Ser¹-Ile¹⁵

Duas membranas idênticas foram separadamente reveladas pelos soros pré-ímmunes e ímmunes dos dois coelhos submetidos a imunização com o conjugado (Figura 14A e 14B). Notou-se que a região escolhida para desenho do peptídeo era imunogênica, uma vez que os soros produzidos contra o peptídeo marcaram bandas correspondentes a BApNA-hidrolase de *C.durissus*. Além disto, o soro de um dos coelhos imunizados reconheceu diferentes proteínas nos venenos de todas as espécies analisadas, indicando a presença de anticorpos com capacidade para manifestar reatividade cruzada.

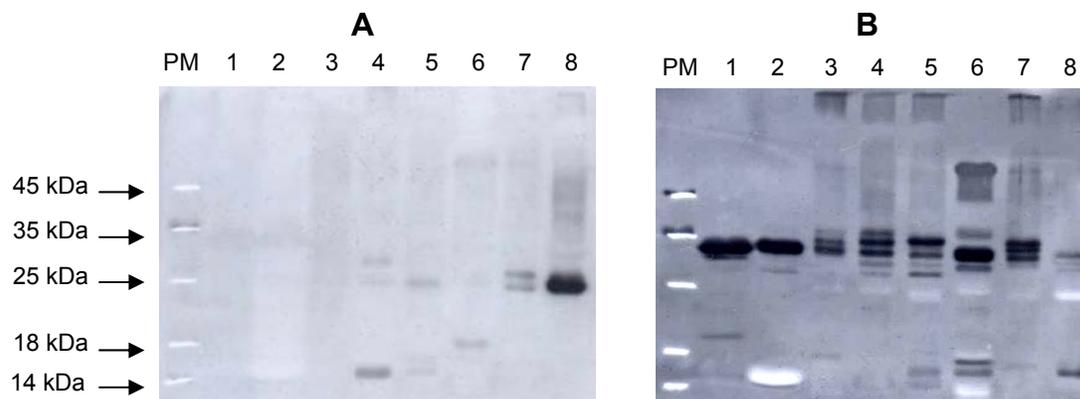


Figura 14- Avaliação por immunoblotting da produção de anticorpos anti-peptídeo pelos coelhos. Duas membranas idênticas foram produzidas por western blot a partir de SDS-PAGE 12 % redutor contendo os seguintes antígenos: (1) 5 µg de BApNA-hidrolase de *C.durissus* purificada e 25 µg dos seguintes venenos; (2) *Crotalus durissus terrificus*, (3) *B. jararaca*, (4) *B. jararacussu*, (5) *B. moojeni*, (6) *B. alternatus*, (7) *B. neuwidi* e (8) *Lachesis muta*. Após eletrotransferência as membranas foram incubadas com soro pré-imune de ambos coelhos 1:1 (A) e imune de ambos coelhos 1:1 (B) em concentrações saturantes. Bandas foram reveladas pela exposição ao filme fotográfico após reação por ECL das membranas incubadas com IgG de carneiro anti-coelho conjugada a HRP.

Em seguida, avaliou-se a produção de anticorpos anti-Ser¹-Ile¹⁵ em cada coelho individualmente. Conforme foi notado, o coelho 1 não produziu anticorpos contra a proteína (Figura 15A). A partir de então, somente foi utilizado o soro do coelho 2 para os estudos imunoquímicos. Também foi verificado por ensaio de dot que o soro do coelho 2 reconhecia a BApNA-hidrolase de *C.durissus* na sua forma nativa (Figura 15B).

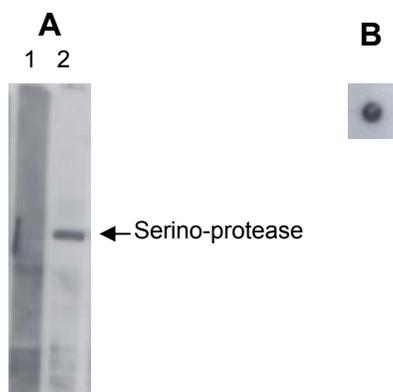


Figura 15- Avaliação da especificidade dos soros produzidos pelos coelhos imunizados. (A) Western blot produzido a partir de SDS-PAGE 12 % submetido contendo 25 μg de veneno de *C.durissus*. Após eletrotransferência as membranas foram incubadas com (1) soro do coelho 1 e (2) soro do coelho 2, nas mesmas diluições. (B) Dot em membrana de nitrocelulose com 5 μg de BApNA-hidrolase de *C.durissus* purificada sem tratamento com agentes desnaturantes ou fervura.

5.4.2- Avaliação da especificidade dos anticorpos

Soro do coelho imunizado e soro antibotrópico e anticrotálico comercial de cavalo foram submetidos às seguintes cromatografias de afinidade: em resina Sepharose contendo o peptídeo ligado pela extremidade aminoterminal (Seph- Ser¹-Ile¹⁵), em resina de vidro com poro controlado com o peptídeo ligado pela extremidade carboxiterminal (Vid-Ile¹⁵-Ser¹) e em resina Sepharose contendo a BApNA-hidrolase do veneno crotálico. A especificidade das frações eluídas de cada cromatografia foi avaliada para os antígenos acima citados. Avaliou-se também a capacidade do peptídeo em inibir a ligação dos anticorpos purificados aos antígenos.

5.4.3- Anticorpos anti-Ser¹-Ile¹⁵

Notou-se que a especificidade dos anticorpos anti-Ser¹-Ile¹⁵ de coelho e de cavalo foi a mesma, se ligando especificamente à BApNA-hidrolase de *C.durissus* e a diferentes proteínas de todas as espécies analisadas (Figura 16B e 16D). Além disso, o

hexadecapeptídeo Ser¹-Ile¹⁶ foi capaz de inibir completamente a ligação dos anticorpos purificados a essas proteínas (Figura 16B e 16E). O soro antitoxínico + anticitotóxico exibiu uma marcação em um grande número de bandas em todos os venenos (Figura 16C) e após a sua purificação, houve marcação de um número menor de bandas, porém com uma intensidade maior nas proteínas reveladas (Figura 16D).

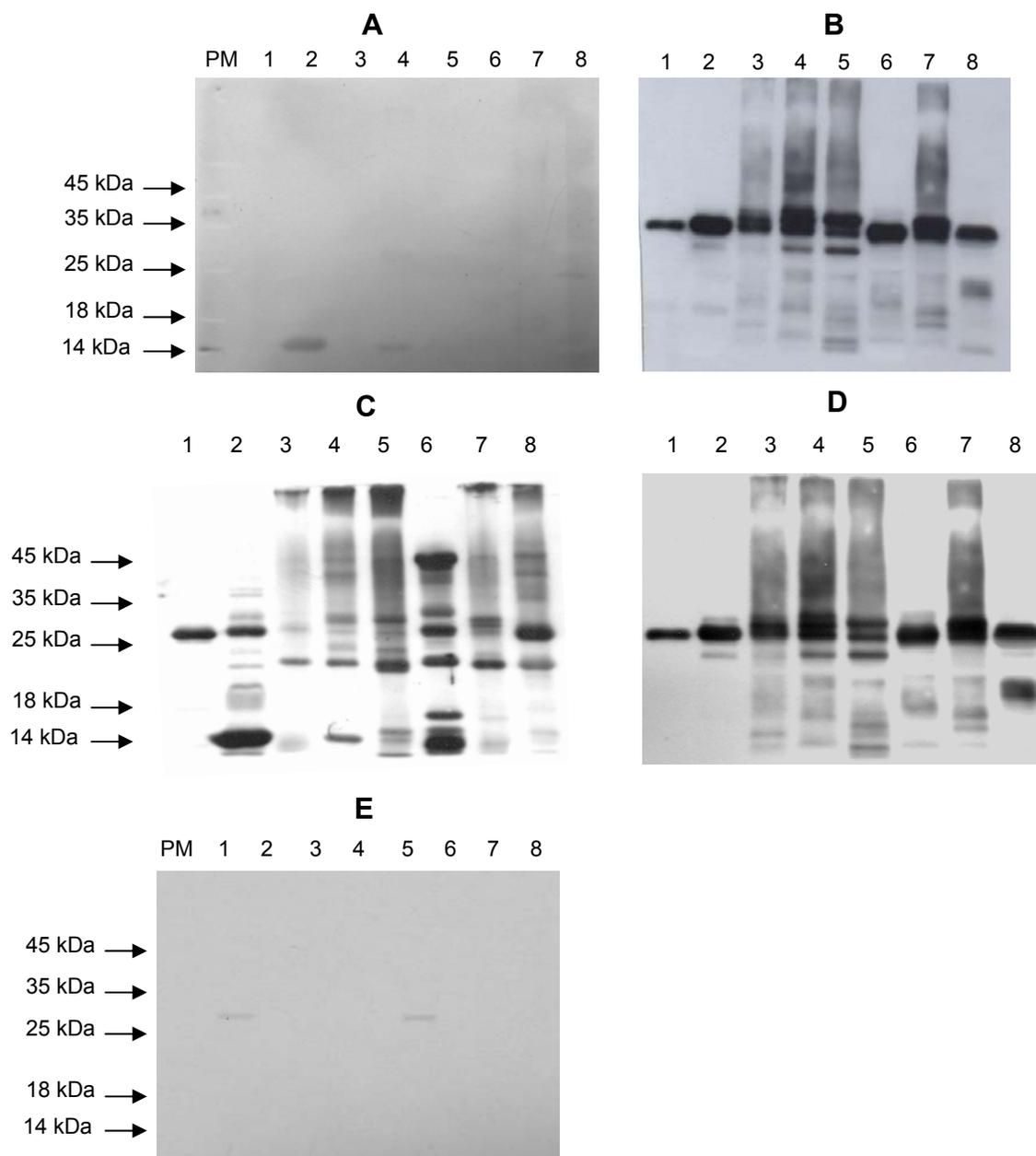


Figura 16- Avaliação por imunoblotting da imunorreatividade de anticorpos purificados de soro de coelho e comercial em Seps-Ser¹-Ile¹⁵. Cinco membranas idênticas foram produzidas por western blot a partir de SDS-PAGE 12 % redutor contendo os seguintes antígenos: (1) 5 µg de BApNA-hidrolase de *C. durissus* purificada e 25 µg dos seguintes venenos; (2) *Crotalus durissus terrificus*, (3) *B. jararaca*, (4) *B. jararacussu*, (5) *B. moojeni*, (6) *B. alternatus*, (7) *B. neuwidi* e (8) *Lachesis muta*. Após eletrotransferência as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos em concentrações saturantes: coelho purificado pré-incubado com Ser¹-Ile¹⁶ (A), coelho anti-Ser¹-Ile¹⁵ (B), soro comercial antibotrópico e anticrotálico (C), soro comercial antibotrópico e anticrotálico purificado pré-incubado com Ser¹-Ile¹⁶ (D) e soro comercial antibotrópico e anticrotálico purificado anti-Ser¹-Ile¹⁵ (E). Bandas foram reveladas pela exposição ao filme fotográfico após reação por ECL das membranas incubadas com IgG de carneiro anti-coelho conjugada a HRP.

5.4.4- Anticorpos anti-Ile¹⁵-Ser¹

Os anticorpos de coelho e de cavalo purificados em Vid-Ile¹⁵-Ser¹ reconheceram a BApNA-hidrolase de *C.durissus* além de outras proteínas nos diferentes venenos analisados. No entanto, os anticorpos purificados de coelho reconheceram um número menor de proteínas, se comparado aos obtidos do soro de cavalo (Figuras 17B e 17D). A ligação de ambos anticorpos purificados aos antígenos foi inibida pelo hexadecapeptídeo Ser¹-Ile¹⁶ (Figuras 17A e 17C).

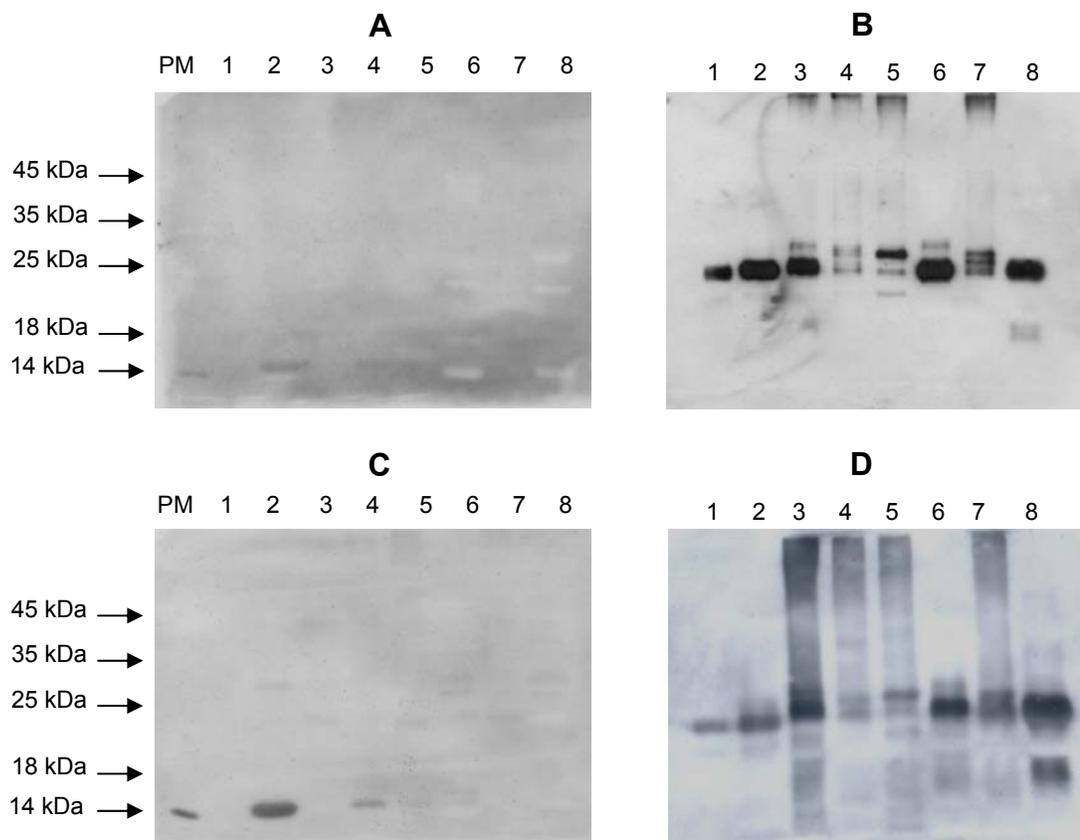


Figura 17- Avaliação por imunoblotting da imunorreatividade de anticorpos purificados de soro de coelho e comercial antibotrópico e anticrotálico em Vid-Ile¹⁵-Ser¹. Quatro membranas idênticas foram produzidas por western blot a partir de SDS-PAGE 12 % redutor contendo os seguintes antígenos: (1) 5 µg de BApNA-hidrolase de *C.durissus* purificada e 25 µg dos seguintes venenos; (2) *Crotalus durissus terrificus*, (3) *B. jararaca*, (4) *B. jararacussu*, (5) *B. moojeni*, (6) *B. alternatus*, (7) *B. neuwidi* e (8) *Lachesis muta*. Após eletrotransferência as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos em concentrações saturantes: coelho purificado em Vid-Ile¹⁵-Ser¹ pré-incubado com Ser¹-Ile¹⁶(A), coelho purificado em Vid-Ile¹⁵-Ser¹ (B), soro comercial antibotrópico e anticrotálico purificado em Vid-Ile¹⁵-Ser¹ pré-incubado com Ser¹-Ile¹⁶ (C) e soro comercial antibotrópico e anticrotálico purificado em Vid-Ile¹⁵-Ser¹ (D). Bandas foram reveladas pela exposição ao filme fotográfico após reação por ECL das membranas incubadas com IgG de carneiro anti-coelho conjugada a HRP.

5.4.5- Anticorpos anti-BApNA-hidrolase de *C.terrificus*

Anticorpos de coelho e de cavalo purificados em Seph-BApNA-hidrolase reconheceram a BApNA-hidrolase de *C.durissus* além de outras proteínas nos diferentes venenos analisados, embora um número muito maior de proteínas tenha sido reconhecido pelos anticorpos do soro de cavalo (Figuras 18B e 18D). O hexadecapeptídeo Ser¹-Ile¹⁶ foi capaz de inibir o reconhecimento dos anticorpos de coelho purificados (Figura 18A). Nenhuma inibição da ligação dos anticorpos obtidos do soro de cavalo foi verificada (Figura 18C).

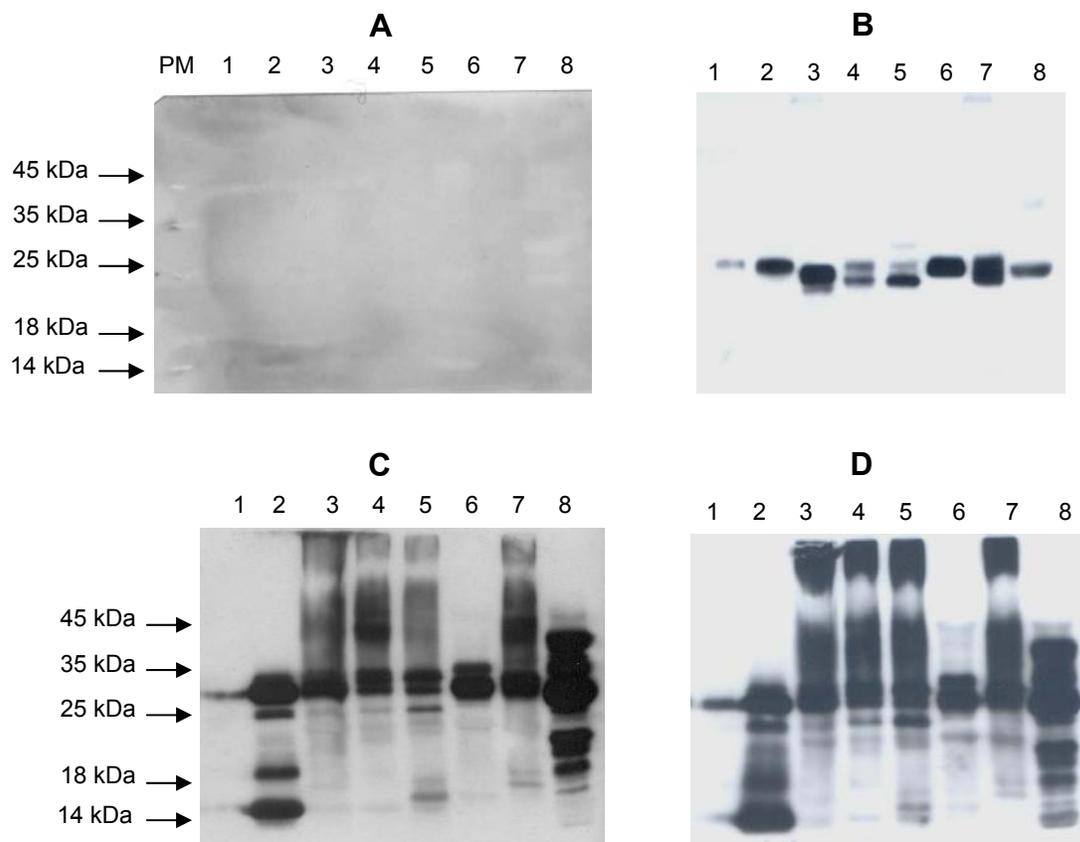


Figura 18- Avaliação por imunoblotting da imunorreatividade de anticorpos purificados de soro de coelho e comercial antibotrópico e anticrotálico em resina Seph-BApNA-hidrolase de *C.durissus* imobilizada. Quatro membranas idênticas foram produzidas por western blot a partir de SDS-PAGE 12 % redutor contendo os seguintes antígenos: (1) 5 µg de BApNA-hidrolase de *C.durissus* purificada e 25 µg dos seguintes venenos; (2) *Crotalus durissus terrificus*, (3) *B. jararaca*, (4) *B. jararacussu*, (5) *B. moojeni*, (6) *B. alternatus*, (7) *B. neuwidi* e (8) *Lachesis muta*. Após eletrotransferência as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos em concentrações saturantes: coelho purificado em Seph-BApNA-hidrolase pré-incubado com o Ser¹-Ile¹⁶ (A), coelho purificado em Seph-BApNA-hidrolase (B), soro comercial antibotrópico e anticrotálico purificado em Seph-BApNA-hidrolase pré-incubado com Ser¹-Ile¹⁶ (C) e soro comercial antibotrópico e anticrotálico purificado em Seph-BApNA-hidrolase (D). Bandas foram reveladas pela exposição ao filme fotográfico após reação por ECL das membranas incubadas com IgG de carneiro anti-coelho conjugada a HRP.

6- DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

6.1- Purificação de BApNA-hidrolase do veneno de *C.durissus*

A abordagem proposta neste estudo do fenômeno da imunorreatividade cruzada em venenos ofídicos foi baseada na utilização de antígenos quimicamente definidos, naturais e sintéticos. A purificação da proteína usada como modelo foi importante por permitir comparação direta de suas propriedades imunoquímicas com aquelas de componentes nos outros venenos ofídicos analisados que apresentaram reatividade imunoquímica cruzada.

O processo de purificação da BApNA-hidrolase do veneno de *C.durissus* mostrou que existem diferentes isoformas desta enzima que se diferenciam pelo conteúdo glicídico (Figura 2). A purificação da enzima até homogeneidade foi alcançada pela combinação de várias etapas como mostrado na Figura 4, incluindo cromatografia de afinidade em resina Seph-p-aminobenzamidina conforme descrito por Alexander (1988). Para os estudos imunoquímicos dos venenos ofídicos, utilizou-se frações correspondentes à F18 (Figura 4) glicosiladas, por não dispormos de PGNase suficiente para deglicosilação de todo o conteúdo utilizado nesses estudos.

6.2- Obtenção de anticorpos de especificidade definida

6.2.2- Produção do conjugado

Uma forma convencional de se obter um imunógeno peptídico é através de seu acoplamento a uma molécula carreadora que pode ser uma proteína conhecida ou um polímero carreador sintético, o que confere uma estrutura macromolecular ao antígeno

peptídico (Sela et al., 1980; Lerner et al., 1982; Bittle et al., 1982). Proteínas carreadoras freqüentemente usadas, como BSA cationizada e KLH, possuem alta massa molecular que limita a formação de conjugados de alta densidade peptídica. Para contornar essa limitação, no intuito de melhorar a imunogenicidade dos peptídeos, foram criados os MAPs, primeiramente descritos por Tam (1988), e que atualmente são amplamente utilizados para imunização de animais para obtenção de anticorpos anti-peptídicos por permitirem a obtenção de conjugados com cerca de 80 % de conteúdo peptídico (Sadler et al., 2002).

Por não dispormos das resinas apropriadas para a produção de MAPs que são produzidos por síntese em fase sólida, desenvolvemos um carreador protéico a partir da proteína crotamina, que permitiu o acoplamento de cinco peptídeos por molécula carreadora, perfazendo um conteúdo peptídico de 60 % (m/m) no conjugado utilizado para imunização.

6.2.3- Escolha do peptídeo imunogênico

Diversas ferramentas de imunoinformática para predição de epítomos protéicos para exposição de antígenos via MHC classe I e II foram relatadas (Flower et al., 2003), incluindo desde programas que predizem a fragmentação de proteínas pelo proteassoma para exposição via MHC I até bancos de dados com seqüências peptídicas que se ligam a moléculas de MHC II conhecidas. No entanto, a utilização de programas para predição de moléculas ligantes a MHC II (MHC-THREAD e ProPred) com a estrutura primária da BApNA-hidrolase de *C.durissus* levou a obtenção de seqüências peptídicas muito diferentes, equivalentes a diferentes regiões da proteína. Essa discrepância observada nas seqüências peptídicas obtidas por diferentes

ferramentas *in silico* reflete possivelmente o conhecimento ainda incompleto dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processamento e na apresentação dos antígenos pelas células do sistema imunológico. Desta forma, para desenho do peptídeo imunogênico, utilizou-se a estrutura tridimensional cristalografada da proteína TSV-PA como protótipo para localizar alças externalizadas na seqüência da proteína giroxina (BAPNA-hidrolase) de *C. durissus*, que possui 60 % de identidade em estrutura primária com essa proteína (Figura 5). A escolha dessas regiões foi embasada pela relação entre superfície de exposição e reatividade antigênica observada por estudos imunológicos envolvendo reatividade de anticorpos produzidos contra a proteína mioemeritina, cuja estrutura cristalografada é conhecida, e contra peptídeos sintéticos equivalentes a diferentes regiões desta proteína (Tainer et al., 1984). As regiões voltas β (que correspondem a torções imediatamente após α -hélice) e alças que são localizadas principalmente nas porções externas de proteínas com estrutura tridimensional cristalografada foram utilizadas para desenho de peptídeos imunogênicos (Chandrasekhar et al., 1991; Mezö et al., 1999; Schlosser et al., 2003).

O peptídeo escolhido, correspondente à alça 5 (Figura 6), possuiu 15 resíduos de aminoácidos. A determinação do seu comprimento se deu a partir de resultados obtidos através de análises cristalográficas de peptídeos endógenos associados à molécula de MHC II (HLA-DR1), no qual foi demonstrado que 13 resíduos de aminoácidos são observados no sítio de interação MHC II e peptídeo (Jardetzky et al., 1996). Antígenos recuperados de complexos com MHC II purificados de linfócitos T apresentaram seqüência de tamanho variável de 13 a 25 resíduos (Rudensky et al., 1991; Chicz et al., 1992).

O peptídeo escolhido foi capaz de estimular a produção de anticorpos anti-BApNA-hidrolase que reagiram com a proteína nos seus estados nativo e desnaturado (Figuras 15A e 15B). Léonetti et al., 1990 mostraram que anticorpos produzidos contra um peptídeo na forma cíclica reconhecem a proteína de origem no estado nativo por mimetizar sua conformação. Por outro lado, foi demonstrado que o peptídeo imunogênico na forma linear se liga mais fortemente ao anticorpo monoclonal antiproteína devido a sua maior flexibilidade estrutural em comparação ao mesmo na forma cíclica (Schlosser et al., 2003). Anticorpos antipeptídeos produzidos contra regiões altamente flexíveis reagem fortemente com a proteína no seu estado nativo, ao passo que anticorpos antipeptídeos de regiões bem ordenadas não reagem (Tainer et al., 1984). Isso mostra que um dos motivos que levam as regiões de alça externalizada a serem regiões imunogênicas em proteínas é a sua flexibilidade estrutural.

6.3- Análise imunoquímica de venenos ofídicos com diferentes antisoros e anticorpos purificados

Soros comerciais antibotrópico e anticrotálico provenientes de cavalos hiperimunizados com venenos de serpentes dessas espécies e soro de coelho obtido a partir de animais imunizados com o peptídeo sintetizado acoplado via aminoterminal a um carreador protéico (conjugado = carreador-Ser¹-Ile¹⁵) foram utilizados como fonte dos anticorpos utilizados para o estudo de imunorreatividade cruzada em venenos ofídicos.

6.3.1- Anticorpos com especificidade para o peptídeo Ser¹-Ile¹⁵

O presente trabalho mostrou que anticorpos purificados de soros comerciais e antipeptídico em resina Sepharose-Ser¹-Ile¹⁵, além de reagir em western blots com

proteínas cujas massas moleculares são compatíveis com as de serino-proteases do veneno de *C. durissus*, também reagiram com componentes dos vários venenos cujas massas moleculares são significativamente diferentes (Figuras 16B e 16D). A reatividade desses anticorpos de especificidade definida com proteínas de massas moleculares semelhantes as da BApNA-hidrolase pode ser decorrente da similaridade entre as seqüências das SVTLEs dos diferentes venenos analisados (Castro et al., 2004), refletindo ainda as semelhanças nas estruturas tridimensionais dessas proteínas, conforme verificado nos modelos estruturais obtidos de SVTLEs de *B. jararaca* (Vitorino-Cardoso et al., 2006) e *L. muta* (Castro et al., 2001). Apesar de não termos caracterizado estruturalmente todas as proteínas que reagiram com anticorpos anti-Ser¹-Ile¹⁵, aquelas cujas massas moleculares sugerem não se tratar de serino-proteases parecem pertencer à família das fosfolipases, que têm massa molecular entre 15 a 18 kDa embora não apresente similaridade de seqüência com as SVTLEs. Stábéli et al., (2005) demonstraram imunorreatividade cruzada de anticorpos anti-undecapeptídeo Ile¹-Hse¹¹, cuja seqüência corresponde ao segmento Ile⁴³⁵-Met⁴⁴⁵ da proteína LAAO de *B. moojeni*, obtidos de soro comercial antibotrópico, com proteínas estruturalmente não relacionadas, como fosfolipase A₂, serino protease e LAAO. No entanto, não se pôde afirmar nesse trabalho contra qual das proteínas reconhecidas, os anticorpos anti- Ile¹-Hse¹¹ foram produzidos pelo animal hiperimunizado. Com o objetivo de produzir anticorpos com especificidade definida para o estudo de imunorreatividade cruzada em toxinas ofídicas, animais foram imunizados com um peptídeo, uma molécula com pouca ou nenhuma restrição conformacional, para obtenção de anticorpos antipeptídeo. Foi sugerido que imunógenos flexíveis levam à produção de

anticorpos de uma variedade de especificidades, gerando conseqüentemente reatividade cruzada com antígenos diversos (Campbell et al., 2000).

6.3.2- Anticorpos com especificidade para o peptídeo Ile¹⁵-Ser¹

Anticorpos anti-Ile¹⁵-Ser¹, obtidos da purificação do soro antipeptídico em Vid-Ile¹⁵-Ser¹, exibiram imunorreatividade apenas com proteínas de massas moleculares semelhantes às das serino proteases (Figuras 17B). Essa reduzida imunorreatividade cruzada observada pode ser explicada pelo sentido de imobilização do peptídeo no suporte utilizado como resina de afinidade, o qual é oposto ao peptídeo acoplado ao carreador utilizado para imunização (Ser¹-Ile¹⁵). O acoplamento do peptídeo através do seu grupo carboxílico terminal à resina pode ter comprometido o reconhecimento pelos anticorpos cujas especificidades eram dirigidas a esta região da molécula. Como o imunógeno usado na preparação dos soros expunha preferencialmente a porção C-terminal do peptídeo, é possível que a purificação do soro antipeptídeo em resina expondo a região de N-terminal selecione um menor número de anticorpos, e essa especificidade mais restrita seria responsável pela menor imunorreatividade cruzada associada a esses anticorpos, purificados por afinidade.

Anticorpos provenientes de soro anticrotálico e antibotrópico purificados nessa resina exibiram imunorreatividade cruzada com proteínas de massas moleculares semelhantes às das serino proteases e de outras proteínas não relacionadas (Figura 17D). Isso se deve ao fato de haver nesses soros hiperimunes um número muito grande de anticorpos contra teoricamente epítomos de todas as proteínas presentes nos venenos utilizados para hiperimunização. Esse elevado número de anticorpos com

especificidades variadas poderá originar a imunorreatividade cruzada com proteínas não relacionadas.

6.3.3- Anticorpos com especificidade para proteína

Verificou-se que anticorpos de soro comercial purificados em resina Seph-IBPA-Suc-BApNA-hidrolase reagiram com proteínas de distintas massas moleculares no veneno de *C. durissus*, além de reconhecerem diferentes proteínas nos demais venenos analisados (Figura 18C). Isso pode ser explicado pelo fato de haver no soro comercial anticorpos contra os inúmeros epítomos das proteínas presentes nos venenos, muitos dos quais seriam recuperados na cromatografia por afinidade em resina contendo uma estrutura protéica complexa como a da BApNA-hidrolase capaz de permitir a ligação de anticorpos produzidos contra epítomos desta e de outras proteínas não relacionadas. Ao contrário, os anticorpos purificados a partir de soro anti-peptídico nessa mesma resina apresentaram um repertório de especificidades mais restrito, refletindo tanto o número de epítomos do imunógeno usado na preparação do soro quanto as restrições conformacionais a que deve estar sujeita a alça 5 da proteína (Figura 6) comparativamente às possibilidades que ocorrem neste segmento peptídico quando livre ou ligado apenas pelo resíduo N-terminal.

6.3.4- Inibição de anticorpos de especificidade definida por Ser¹-Ile¹⁶

Nossos resultados mostraram que o peptídeo Ser¹-Ile¹⁶ tem a capacidade de inibir completamente a reatividade dos anticorpos de especificidade para Ser¹-Ile¹⁵ e Ile¹⁵-Ser¹ com as demais proteínas não relacionadas (Figuras 16A, 16E, 17A e 17C). Considerando que os peptídeos são pequenas moléculas que possuem pouca ou

nenhuma restrição estrutural quando em solução, pode-se supor que a conformação do peptídeo isolado não seja necessariamente a mesma deste segmento particular na estrutura da proteína nativa. Desta forma, essa capacidade inibitória do peptídeo em solução deve-se a sua alta flexibilidade estrutural e capacidade de gerar isômeros conformacionais que se adaptam a diferentes regiões ligantes dos anticorpos.

Por outro lado, embora se pôde verificar inibição da interação entre anticorpos provenientes do soro anti-peptídeo purificados em resina com a BApNA-hidrolase imobilizada (Figura 18A), não se verificou quaisquer inibições dos anticorpos provenientes do soro comercial purificados nessa resina (Figura 18C). Essa ausência de inibição verificada se deve à presença de inúmeros anticorpos com especificidades para todos epítopos da BApNA-hidrolase no soro comercial que se ligaram à resina, e, desta forma, o peptídeo Ser¹-Ile¹⁶ foi capaz de inibir apenas anticorpos com especificidade para a região Ser¹⁰⁰-Ile¹¹⁵ da BApNA-hidrolase (equivalente a alça 5), deixando ativos contra os demais epítopos dessa proteína.

A mobilidade estrutural é uma parte essencial no processo de reconhecimento antigênico (Tainer et al., 1984). O reconhecimento da proteína nativa pelos anticorpos anti-peptídeo pode ser explicado pelo fato de o peptídeo escolhido equivaler a uma alça externa da proteína, a qual possui característica de região de alta flexibilidade. Anticorpos produzidos contra moléculas altamente flexíveis são capazes de reconhecer estruturas protéicas com mobilidade conformacional mais restrita porque pequenas desordens locais em um curto segmento da proteína nativa produzem conformações que mimetizam algumas das decorrentes da flexibilidade estrutural do peptídeo em solução (Westhof et al., 1984). Por outro lado, estudos baseados na estrutura tridimensional de complexos antígeno-anticorpo têm demonstrado que determinados

anticorpos existem na forma de isômeros conformacionais, fazendo com que uma mesma estrutura primária exiba arranjos tridimensionais diferentes nos complexos formados com diferentes antígenos (Foote et al., 1994; James et al., 2003; Jimenez et al., 2003). Desta forma, a flexibilidade estrutural do antígeno deve contribuir para a adaptação conformacional entre antígeno e anticorpo através de mecanismos de seleção conformacional ou ajuste induzido, assim modulando a especificidade do anticorpo e a reatividade cruzada (Davis e Cohen, 1996; Berger et al., 1999; Campbell et al., 2000; Wu et al., 2000).

7- CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

- Através de reações de redução, carboximetilação, succinilação e hidrazidação da crotamina, desenvolvemos um carreador protéico com múltiplos sítios de acoplamento que permitiu que, em média, até cinco peptídeos com aldeído terminal fossem ligados por molécula carreadora;
- O peptídeo Ser¹-Ile¹⁵, que corresponde à seqüência Ser¹⁰⁰-Ile¹¹⁵ na estrutura da BApNA-hidrolase de *C.durissus*, mostrou-se imunogênica para coelhos quando acoplado na proporção de 5:1 em relação ao carreador;
- Anticorpos de coelhos produzidos contra o peptídeo Ser¹-Ile¹⁵ e purificados por afinidade em resina Seph-Ser¹-Ile¹⁵ exibem reatividade cruzada com componentes aparentemente não relacionados estruturalmente de venenos de diferentes espécies;
- A produção de resinas contendo o peptídeo acoplado em sentidos opostos, através dos resíduos N- ou C-terminais, permitiu-nos verificar que o sentido de acoplamento do peptídeo ao carreador é um fator determinante da especificidade dos anticorpos antipeptídeo produzidos;
- Soros anticrotálicos para fins terapêuticos possuem anticorpos contra vários epítomos da BApNA-hidrolase de *C.durissus*, além dos anti- Ser¹-Ile¹⁵;

8- RESUMO

8- RESUMO

É amplamente aceita a imunorreatividade cruzada envolvendo toxinas ofídicas mediada por anticorpos que reconhecem componentes de diferentes venenos que trazem homologia de seqüência de aminoácidos ou alguma relação funcional. Recentemente, foi demonstrado que anticorpos antifrimento de L-aminoácido oxidase (LAAO), obtidos de soro antibotrópico poliespecífico, reagem com componentes de venenos que não possuem qualquer relação estrutural. No presente trabalho, fazendo uso da estrutura tridimensional cristalografada de um ativador de plasminogênio presente no veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA), nós escolhemos o peptídeo SSEHIAPLSLPSSPPI, pertencente a uma alça externa de uma proteína coagulante de *C.durissus* (giroxina), acoplamos a um carreador polivalente produzido a partir da proteína crotamina e imunizamos coelhos. Os anticorpos produzidos, além de reconhecerem a giroxina, foram capazes de reagir com componentes de venenos de diferentes espécies que aparentemente não guardam qualquer relação estrutural. A identificação desses componentes foi feita por análise de immunoblotting, a qual mostrou bandas reveladas na altura de proteínas da família das fosfolipases, as quais não possuem qualquer relação estrutural com as proteínas homólogas à trombina. Também foi demonstrado que anticorpos purificados em resina contendo o peptídeo imobilizado no mesmo sentido do seu acoplamento ao carreador utilizado para imunização (N-terminal acoplado), mostram maior reatividade cruzada que aqueles obtidos de resinas com o peptídeo no sentido oposto (C-terminal acoplado). Nós hipotetizamos que a reatividade de anticorpos anti-peptídeo com componentes não relacionados estruturalmente está relacionada à alta flexibilidade estrutural de moléculas peptídicas e à adaptação conformacional de suas moléculas ligantes, os anticorpos. Além disso, acreditamos que esse trabalho contribuiu para um aprofundamento no nível de discussão sobre imunorreatividade cruzada em venenos ofídicos uma vez que faz uso de um novo modelo experimental, utilizando reagentes imunoquímicos, antígeno e anticorpo de especificidade definida.

9- ABSTRACT

9- ABSTRACT

It is widely established that antivenoms cross-react with venoms of phylogenetically related species, and that anti-toxin antibodies cross-react with other functionally and structurally related components of homologous and heterologous venoms. Only recently it was shown that affinity-purified antibodies against an undecapeptide derived from *B.moojeni* L-amino acid oxidase cross-reacted with functionally unrelated venom toxins, among which two serine proteases and a phospholipase A₂ homolog. In the present work we confirmed and extended the demonstration that immunological cross-reactivity in snake venoms involves functionally unrelated proteins. First, we prepared rabbit anti-sera against a synthetic peptide (SSEHIAPLSLPSSPPI) whose sequence was chosen among those of the various external loops of the *Crotalus durissus* thrombin-like enzyme, as judged by the crystallographic 3-D structure of the homologous (70% sequence similarity) *Trimeresurus stejnegeri* plasminogen activator. The specificities of these antisera were then studied by using the affinity-purified anti-peptide antibodies to probe western blots of venoms of representative brazilian snakes, indicating that components besides the parental coagulating enzyme were also labeled in most cases. The specificities of the affinity-purified antibodies varied slightly depending on the N- or C- terminal coupling orientation of the peptide during the immunoabsorbent preparation. In summary, the anti-peptide antibodies raised against a well defined segment of the *C.durissus* thrombin-like enzyme cross-reacted with functionally unrelated venom components, as judged by the western blot analyses.

10- REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

10- REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*, 26, 953-960.
- Berger, B.,J. ; Bhatti, A.R., 1989. Snake venom components and their cross-reactivity: a review. *Biochem. Cell. Biol.*, 67, 597-601.
- Berger, C., Weber-Bornhauser, S., Eggenberger, J., Hanes, J., Plückthun, A., Bosshard, H.R., 1999. Antigen recognition by conformacional selection. *FEBS Lett.*, 450, 149-153.
- Bergmeyer, H.U., 1974. *Methods of enzymatic analysis*, 1, 515-576.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Sinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J., Brown, F., 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298, 30-33.
- Boquet, P., 1979. Immunological properties of snake venoms. In: Lee, C.Y.(Ed), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. Springer, Berlin, pp. 751-824.
- Cameron, D.J. and Erlanger, B.F., 1977. Evidence for multispecificity of antibody molecules. *Nature* 268, 763-765.
- Campbell, A.P., Wong, W.Y., Irvin, R.T., Sykes, B.D., 2000. Interaction of a bacterially expressed peptide from the receptor binding domain of *Pseudomonas aeruginosa* pili strain PAK with cross-reactive antibody: conformation of bound peptide. *Biochemistry*, 39, 14847-14864.
- Castro, H.C., Silva, D.M., Craik, C., Zingali, R.B., 2001. Structural features of snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547, 183-195.
- Castro. H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 843-856.

- Cauerhff, A., Goldbaum, F.A., Braden, B.C., 2004. Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody. PNAS, 101, 3539-3544.
- Chan, W., White, P.D., 2003. Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach. New York: Oxford University press.
- Chandrasekhar, K., Profy, A.T., Dyson, H.J., 1991. Solution conformational preferences of immunogenic peptides derived from the principal neutralizing determinant of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. Biochemistry, 30, 9187-9194.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Laue, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A.A., Striminger, J.L., 1992. Nature, 348, 213-216.
- Choumet, V., Jiang, M.S., Specker, I., Bon, C., 1991. Immunochemical cross-reactivity of two phospholipase A₂ neurotoxins, agkistrodotoxin and crotoxin. Toxicon, 29, 441-451.
- David, M.P.C., Asper, J.J.T., Ibane, J.S.A., Concepcion, G.P., Padlan, E.A., 2006. A study of structural correlates of affinity maturation: Antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability. Mol. Immunol. *in press*.
- Davies, D.R., Cohen, G.H., 1996. Interaction of protein antigens with antibodies. Proc. Nat. Aca. Sci. USA, 93, 7-12.
- Demirel, M.C., Lesk, A.M., 2005. Molecular forces in antibody maturation. Physical Review Letters 95, 208106-1 – 208106-3.
- Dong, L.V., Quyen, L.K., Eng, K.H., Gopalakrishnakone, P., 2005. Immunogenicity of venoms from four common snakes in the South of Vietnam and development of ELISA kit for venom detection. Journal of Immunological Methods, 282, 13-31.
- Earlander, B. F., Kokowsky, N. and Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archs Biochem. Biophys., 95, 271-278.
- Fahey, J.L., Terry, E.W., 1978. Ion exchange chromatography and gel filtration. Handbook of Experimental Immunology 1, 8.1-8.16.

- Fields, R., 1972. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods in Enzymology*, 38, 464-468.
- Flower, D.R., 2003. Towards *in silico* prediction of immunogenic epitopes. *TRENDS in immunology*, 24, 667-674.
- Foote, J., Milstein, C., 1994. Conformational isomerism and diversity of antibodies. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, 91, 10379-10374.
- French, D.L., Laskov, R., Sharff, M.D. 1989. *Science*, 244, 1152.
- Freund, J., McDermott, K., 1942. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biology*, 49, 548.
- Gaetner, H.F., Rose, K., Cotton, R., Timmis, D., Camble, R., Offord, R.E., 1992. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjugate Chemistry*, 3, 262-268.
- Geoghegan, K.F., Stroh, J.G., 1992. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chemistry*, 3, 138-146.
- Githens, T.S., Butz, L.W., 1929. Venoms of North American snakes and their relationships. *Journal of Immunology*, 16, 71-80.
- Glyko's 1998. Catalog of products and services, página 48.
- Gross, E., Witkop, B., 1962. Nonenzymatic cleavage of peptides bounds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 1856-1860.
- Harrison, R. A., Wuster, W., Theakston, R.D.G., 2003. The conserved structure of snake venoms toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. *Toxicon*, 41, 441-449.
- Henderson, J. T., Bieber, A. L., 1986. Antigenic relationships between mojave toxins subunits, mojave toxin and some crotalid venoms. *Toxicon*, 24, 473-479.
- Henriques, E., Fonseca, N., Ramos, M.J., 2004. On the modeling of snake venom serine proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. *Protein Sciences*, 13, 2355-2369.

- Herbert, W.J., 1978. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. *Handbook of Experimental Immunology*, 3, A3.1-A3.15.
- James, L.C., Roversi, P., Tawfik, D.S., 2003. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science*, 299, 1362-1367.
- Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1996. Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 734-738.
- Jimenez, R., Salazar, Georgina, Yin, J., Joo, T., Rosemberg, F.E., 2004. Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *PNAS*, 101, 3803-3808.
- Kramer, A., et al., 1997. Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell*, 91, 799-809.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamb, G., 1902. On the precipitin of cobra venom. A means of distinguishing between the proteins of different snake poisons. *Lancet II*, 431-435.
- Landsteiner, K., *Wein. Klin. Wochenschr.*, 10, 439 (1897).
- Léonetti, M., Pillet, L., Maillère, B., Lamthanh, H., Frachoon, P., Couderc, J., Ménez, A., 1990. Immunization with a peptide having both T cell and conformationally restricted B cell epitopes elicits neutralizing antisera against a snake neurotoxin. *The Journal of Immunology*, 145, 4214-4221.
- Lerner, R.A., 1982. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature*, 299, 592-596.
- Liu, T., Boykins, R.A., 1989. Hydrolysis of proteins and peptides in a hermetically sealed microcapillary tube: high recovery of labile amino acids. *Anal. Biochemistry*, 182, 383-387.
- Mariuzza, R.A. and Poljak, R.J. 1993. The basics of binding: Mechanisms of antigen recognition and mimicry by antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 50-55.
- Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, 42, 1171-1181.

- Martinez, R. A., Huang, S. Y., Perez, J. C., 1989. Antigenic relationships of fractionated western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) hemorrhagic toxins and other rattlesnake venoms as indicated by monoclonal antibodies. *Toxicon*, 27, 239-245.
- Mezo, G., Majer, Zs., Valero, M.L., Andreu, D., Hudecz, F., 1999. Synthesis of cyclic herpes simplex virus peptides containing 281-284 epitopes of glycoprotein D-1 in endo or exo-position. *J.Peptide Sci*, 5, 272-282.
- Minton Jr., S. A., 1979. Common antigens in snake venoms. In: Lee, C.Y.(Ed), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. Springer, Berlin, pp. 847-862.
- Nakamura, M., Kinjoh, K., Kosugi, T., 1992. Production a monoclonal antibody against the thrombin-like enzyme, habutobin, from *Trimeresurus flavovirides* venom *Toxicon*, 30, 1177-1188.
- Notkins, A.L., 2004. Polireactivity of antibody molecules. *TRENDS in Immunology*, 25, 174-179.
- Parry, M.A., Jacob, U., Huber,R., Wisner, A., Bon, C., Bode, W., 1998. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*, 6(9), 1195-206.
- Phisalix, C., Bertrand, G., (1894a). Atténuation du venis du vipere par la charleur et vaccination du cobaye contre ce venim. Le serum sanguine des animaux vaccines. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 48, 148-150.
- Phisalix, C., Bertrand, G., (1894b). Sur la propriété antitoxique de sang des animaux vaccinés contre lè venin de vipère. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 118, 356-358.
- Pirkle, H., 1998. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. *Thromb. Haemost.*, 79, 675–683.
- Rael, E. D., Salo, R.J., Zepeda, H., 1986. Monoclonal antibodies to *mojave* toxins and use for isolation of cross-reacting proteins in *Crotalus* venoms. *Toxicon*, 24, 661- 668.

- Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., Janeway, C.Jr., 1992. *Nature*, 358, 764-768.
- Sadler, K., Tam, J.P., 2002. Peptides dendrimers: applications and synthesis. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 90, 195-229.
- Schlosser, G., Mező, G., Kiss, R., Vass, E., Majer, Z., Fejlbrieff, M., Perczel, A., Bósze, S., Welling-Wester, S., Hudecz, F., 2003. Synthesis, solution structure analysis and antibody binding of cyclic epitope peptide from glycoprotein D of Herpes simplex virus type I. *Biophysical Chemistry*, 106, 155-171.
- Sela, M., Arnorn, R., 1980. News developments with human and veterinary vaccines. Liss, new York, pp 315-323.
- Sethi, D.K., Agarwal, A., Manivel, V., Rao, K.V.S., Salunke, D.M., 2006. Differential epitope positioning within the germline antibody paratope enhances promiscuity in the primary immune response. *Immunity*, 24, 429-439.
- Slotta, C.H. ; Fraenkel-Conrat, H.L. 1938. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* 12: 505-513.
- Sluyterman, L.A.AE. and Elgersma, O., 1978. Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. *Journal of Chromatography*, 150, 17-30.
- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206.
- Stábeli, R.G., Magalhães, M.P., Selistre-de-Araujo, H.S., Oliveira, E.B., 2005. Antibodies to a fragment of the Bothrops moojeni L-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. *Toxicon*, 46, 308-317.
- Tainer, A.J., Getzoff, E.D., Alexander, H., Houghten, R.A., Olson, A.J., Lerner, R.A., 1984. The reactivity of anti-peptide antibodies is a functional of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature*, 312, 127-134.

- Tam, J.P., 1988. Synthetic peptide vaccine design: syntheses and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85, 5409-5413.
- Tan, N.-H., Lim, K.-H., Jaafar, M.I.N., 1993. An investigation into the antigenic cross-reactivity of *Ophophagus hannah* (King cobra) venom neurotoxin, phospholipase A₂ hemorrhagin and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 31, 865-872.
- Tan, N.-H., Pondurai, G., 1994. An investigation on the antigenic cross-reactivity of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom hemorrhagin, thrombin-like enzyme and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 32, 1265-1269.
- Theakston, R.D.G., Reid, H.A., 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon*, 17, 511-515.
- Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., Griffiths, E., 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 41, 541-557.
- Varga, J.M., Kalchschmid, G., Klein, G.F., Fritsch, P., 1991. Mechanism of allergic cross-reactions-I. Multispecific binding of ligands to a mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody. *Molecular Immunology*, 28, 641-654.
- Vitorino-Cardoso, A.F., Ramos, O.H.P., Homsí-Brandeburgo, M.I., Selistre-de-Araújo, H.S., 2006. Insight into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144, 334-342.
- Webster, D.M., Henry, A.H., and Rees, A.R. 1994. Antibody-antigen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 123-129.
- Westhof, E., Altschuh, D.M., Bloomer, A.C., Mondragon, A., Klug, A., Van Regenmortel, M.H.V., 1984. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature*, 311, 123-126.
- Wu, G., MacKenzie, R., Durda, P.J., Tsang, P., 2000. The binding of a glycoprotein 120 V3 loop peptide to HIV-1 neutralizing antibodies. *J. Biol. Chem.*, 275, 36645-36652.

- Yin, J., Beuscher IV, A.E., Andryski, S.E., Stevens, R.C., Schultz, P.G., 2003. Structural plasticity and the evolution of antibody affinity and specificity. *J. Mol. Biol.*, 330, 651-656.
- Yin, J., Mundorff, E.C., Yang, P.L., Wendt, K.U., Hanway, D., Stevens, R.C., Schultz, P.G., 2001. A comparative analysis of the immunological evolution of antibody. *Biochemistry*, 40, 10764-10773.
- Zhu, Z., Liang, Z., Zhang, T., Zhu, Z., Xu, W., Teng, M., Niu, L., 2005. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)