

Dissertação de Mestrado

VÍCTOR GARCIA FREIRE

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EPÍTOPOS
CONFORMACIONAIS DE DUAS PROTEÍNAS, CROTOXINA E
CROTAMINA, DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus***



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

VÍCTOR GARCIA FREIRE

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EPÍTOPOS
CONFORMACIONAIS DE DUAS PROTEÍNAS, CROTOXINA E
CROTAMINA, DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F866p Freire, Víctor Garcia.

Predição e caracterização de epítomos conformacionais de duas proteínas, crotóxina e crotamina, da serpente *Crotalus durissus terrificus* / Victor Garcia Freire. – 2017.

74 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientador: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Soro anticrotálico. 2. Soro antiofídico. 3. Veneno de serpentes. 4. Anticorpos neutralizantes. 5. Crotóxina. 6. Crotamina. I. Título.

CDD. 23, ed. 615.942



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **Victor Garcia Freire** sob o título **"PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EPÍTOPOS CONFORMACIONAIS DE DUAS PROTEÍNAS, CROTOXINA E CROTAMINA, DA SERPENTE *Crotalus durissus terrificus*"**, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação.

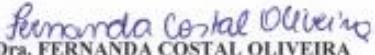
Criciúma, SC, 07 de julho de 2017.



Prof. Dr. CLAUDIO TEODORO DE SOUZA
Membro Relator



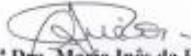
Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER
Membro Interno



Prof.ª Dra. FERNANDA COSTAL OLIVEIRA
Membro Externo



Prof. Dr. Ricardo André Machado de Ávila
Orientador



Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação de mestrado foi elaborada seguindo a Resolução N. 08/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LABIM, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

Acidentes com serpentes são considerados um problema de saúde pública, estando inclusos na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde. No Brasil, a peçonha crotálica é considerada a mais tóxica com letalidade aproximada de 72% em casos não tratados e de 5% nos tratados com soroterapia. Sua composição é variada contendo moléculas, como enzimas, toxinas, peptídeos, carboidratos, e aminoácidos. Dentre as toxinas identificadas no veneno, as principais são a crotamina e a crotoxina. O soro comercial utilizado para o tratamento dos envenenamentos com esta serpente é produzido pela hiperimunização de cavalos com venenos do gênero *Crotalus*, o que gera problemas bioéticos, já que os animais imunizados sofrem os sintomas de envenenamento. Desta forma, a identificação e sínteses de epítomos das principais toxinas do veneno, surgem como uma alternativa para substituir o veneno na produção de moléculas imunológicas capazes de induzir a formação de anticorpos específicos. Este estudo teve como objetivo sintetizar dois peptídeos identificados por técnicas de bioinformática como epítomos conformacionais da crotoxina e crotamina e avaliá-los como imunógenos. As análises *in silico* indicaram que os peptídeos desenhados eram epítomos conformacionais para a crotoxina e crotamina. Os resultados de ELISA mostraram que ambos os peptídeos foram capazes de ligar aos anticorpos gerados, comprovando, assim, sua capacidade antigênica, e os peptídeos também foram capazes de reconhecer o soro anticrotálico. Já os resultados da soroneutralização *in vivo* mostrou que também foram capazes de neutralizar o efeito letal do veneno em 100% dos animais imunizados com eles. Por estes peptídeos não serem tóxicos, apresentam-se como uma ótima alternativa na substituição do veneno para produção do soro anticrotálico.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*; crotoxina; crotamina; epítomo conformacional; soro anticrotálico; anticorpos neutralizantes.

ABSTRACT

Accidents with snakes are considered a public health problem and are included in the list of Neglected Tropical Diseases of the World Health Organization. In Brazil, crotalic venom is considered the most toxic and has a lethality of approximately 72% in untreated cases and 5% in those treated with serum therapy. Its composition is varied containing molecules such as enzymes, toxins, peptides, carbohydrates, and amino acids. Among the toxins identified in the venom, the main ones are crotamine and crotoxin. The commercial serum used for the treatment of poisoning with this snake is produced by the hyperimmunization of horses with venoms of the genus *Crotalus*, which causes bioethical problems, since the immunized animals suffer the symptoms of poisoning. In this way, the identification and synthesis of epitopes of the main toxins of venom arise as an alternative to replace the venom in the production of immunological molecules capable of inducing the formation of specific antibodies. This study aimed to synthesize two peptides identified by bioinformatics techniques as conformational epitopes of crotoxin and crotamine and to evaluate them as immunogens. *In silico* analyzes showed that the peptides designed were conformational epitope for the crotoxin and crotamine. The results of ELISA showed that both peptides were able to bind to the generated antibodies, thus demonstrating their antigenic capacity, and the peptides were also able to recognize the antivenom serum. The results of *in vivo* serum neutralization showed that they were also able to neutralize the lethal effect of venom in 100% of the animals immunized with them. Because these peptides are non-toxic, they are a great alternative in the substitution of venom for the production of antivenom serum.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*; Crotoxin; Crotamine; Conformational epitope; Anticrotic serum; Neutralizing antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição dos tipos de acidentes ofídicos.....	24
Figura 2 - Distribuição dos óbitos e letalidade (=LET).....	25
Figura 3 - Manifestações do envenenamento por <i>Crotalus</i>	29
Figura 4 - Ilustração de um epítopo específico de um antígeno.....	32
Figura 5 - Estrutura tridimensional da Crotamina e Crotoxina.	42
Figura 6 - Resultados da seleção dos aminoácidos mais acessíveis da Crotoxina.....	43
Figura 7 - Resultados da seleção dos aminoácidos mais acessíveis da crotamina.....	44
Figura 8 - Epítopo conformacional predito da Crotoxina.....	45
Figura 9 - Epítopo conformacional predito da Crotamina.....	46
Figura 10 - Reatividade avaliada por ELISA indireto do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	48
Figura 11 - Reatividade avaliada por ELISA indireto dos peptídeos sintetizados.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos recomendado em caso de acidentes as serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	31
Tabela 2 - Resultados da Neutralização <i>in vivo</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ADAM's	Desintegrina e Met aloprotease (do inglês: <i>A Desintegrin and Met alloprotease</i>)
BCR	Receptor de célula B (do inglês <i>B-cell receptor</i>)
BLAST	Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais (do inglês: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
DCM	Diclorometano
DIPC	Diisopropilcabodiimida
DMF	Dimetilformamida
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i>)
Fmoc	Fluorenil-metil-oxicarbonila
IgG	Imunoglobulina G
JPD	Java Protein Dossier
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês: <i>Major histocompatibility complex</i>)
OPD	Ortofenildiamina
PDB	Banco de dados de Proteínas (do inglês: Banco de Dados de Proteínas)
PLA ₂ s	Fosfolipases
SVMPs	Met aloproteases de Veneno de Serpentes (do inglês: <i>snake venom Met alloprotease</i>)
TCR	Receptor de célula T (do inglês <i>T-cell receptor</i>)
TES	Trietilsilano (do inglês: <i>Triethylsilane</i>)
TFA	ÁcidoTrifluoracético (do inglês: <i>Trifluoroaceticacid</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OFIDISMO	24
1.2 ACIDENTES CROTÁLICOS.....	25
1.3 CROTOXINA	27
1.4 CROTAMINA.....	27
1.5 ENVENENAMENTO COM SERPENTES DO GÊNERO CROTALUS.....	28
1.6 TRATAMENTO	30
1.7 INTERAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO	31
1.7.1 <i>Epítomos</i>	31
1.7.2. <i>Mapeamento de Epítomos</i>	33
1.8 BIOINFORMÁTICA	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	37
3.1.1 <i>Bancos de Dados</i>	37
3.1.3 <i>Design do Peptídeo</i>	37
3.2 SÍNTESE SOLÚVEL DE PEPTÍDEOS	37
3.3 IMUNIZAÇÕES	39
3.4 TESTE SOROLÓGICOIMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	40
3.5 ANÁLISE DE NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VIVO</i>	40
4 RESULTADOS	42
4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL.....	42
4.2 PREDIÇÃO, DESIGNER E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	42
4.3 SÍNTESES DE PEPTÍDEOS	46
4.4 AVALIAÇÃO ANTIGÊNICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	47
4.5 AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	50
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO(S)	72
ANEXO A – Certificado da CEUA/UNESC.	73

1 INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade, o homem tem buscado utilizar o veneno de serpente em seu próprio benefício. Aristóteles, Hipócrates e Plínio escreveram sobre a sua multiplicidade de efeitos e Galeano regularmente usava venenos como agentes terapêuticos. A própria serpente, incluindo o seu veneno, era usada em muitas preparações, pulverizada ou macerada. Supunha-se que o animal transmitisse as propriedades do seu veneno ao líquido no qual era misturado. No entanto, os primeiros trabalhos tentando identificar os componentes de venenos de serpentes somente ocorreram no século XIX. (Cunha, Martins, 2012)

Em 1843, Lucien Bonaparte purificou uma substância do veneno de uma víbora, a qual denominou viperina, por meio de uma série de precipitações com álcool e éter. Já Mitchell, em 1860, isolou a crotalina do veneno de uma cascavel, utilizando o método de filtração por uma membrana semipermeável (Oguiura, 1998). Desde então, paralelamente à evolução da ciência, muito se tem acumulado de conhecimento sobre as toxinas em geral.

Apesar de ser um problema muito antigo, os acidentes ofídicos ainda representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela morbimortalidade que ocasionam. Existem, em todo o mundo, aproximadamente 10 mil espécies de serpentes, das quais 10 – 14% são consideradas peçonhentas (Amaralet al 1988). Dentre as espécies peçonhentas encontradas em nosso país, vinte pertencem ao gênero *Bothrops* (Jorge, Ribeiro 1990; Bercoviciet al, 1987), dezenove ao gênero *Micrurus*, uma ao gênero *Crotalus* e uma ao gênero *Lachesis* (Bercoviciet al, 1987).

A elucidação farmacológica e bioquímica do veneno de animais e de suas toxinas é da mais alta importância sob múltiplos aspectos. Somente por meio desta é possível adquirir conhecimento adequado da fisiopatologia dos envenenamentos e instituir medidas racionais e eficientes para o seu tratamento. Assim, diversos estudos com o venenos de animais peçonhentos vem revelando algumas substâncias promissoras para a finalidade terapêutica. Um ótimo exemplo são os resultados observados por Rocha e Silva que em 1948. Estes autores descobriram peptídeos hipotensores no venenos botrópicos que serviram como modelo para o desenho de drogas hipotensivas muito usadas atualmente, como o Captopril® (Bon, 1994; Oliveira, 2014).

1.1 OFIDISMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no mundo ocorrem por ano entre 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas, causando de 30.000 a 40.000 mortes (Swaroop, Grab, 1968). No Brasil, ocorrem mais de 130.000 acidentes ofídicos por ano (SINAN, 2014), com uma mortalidade aproximada de 0,45%. Dentre as principais serpentes causadoras desses acidentes, encontram-se as dos gêneros: Bothrops (com as espécies popularmente conhecidas como, jararaca, jarucuçu, caçara, urutu, combóia, dentre outras); Crotalus (popularmente conhecida como cascavel); e raros acidentes causados por Lachesis (popularmente conhecida como surucucu, surucutinga) e por Micrurus (popularmente conhecida coral verdadeira) (Cardoso, Brando, 1982).

Acredita-se que o número de acidentes no país é ainda muito maior, já que muito dos casos não são notificados ou a serpente não é identificada. Nos casos em que o gênero da serpente foi identificada, 86,2% eram do gênero Bothrops, em seguida por Crotalus (9%), Lachesis (3,9%) e Micrurus (0,9%) (SINAN, 2014), como mostra a figura 1. Apesar da maioria dos acidentes ocorrerem com as serpentes do gênero botrópico, os casos mais letais, são com as serpentes do gênero Crotalus, já que enquanto os casos com Bothrops a letalidade gira em torno de 0,37%, os acidentes crotálicos apresentam uma letalidade em torno de 0,96%, como mostra a figura 2 (SINAN, 2014).

Figura 1 - Distribuição dos tipos de acidentes ofídicos de acordo com a faixa etária (número totais de casos de 2009 a 2013).

Faixa Etária	Botrópico Nº casos	Botrópico %	Crotálico Nº casos	Crotálico %	Laquético Nº casos	Laquético %	Elapídico Nº casos	Elapídico %
< 1	1.186	1,14	115	1,05	58	1,22	12	1,08
1-4	1.845	1,76	171	1,56	73	1,55	55	4,95
5-9	5.058	4,83	468	4,28	286	6,03	41	3,7
10-14	9.028	8,63	709	6,48	519	10,95	65	5,87
15-19	10.253	9,8	905	8,28	536	11,33	97	8,85
20-39	37.047	35,38	3.731	34,13	1.814	38,28	447	40,37
40-59	29.593	28,25	3.502	32,04	1.065	22,48	293	26,46
60-64	4.363	4,16	494	4,52	166	3,5	45	4,05
65-69	2.837	2,7	383	3,5	104	2,2	14	1,25
70-79	2.774	2,65	375	3,43	95	2	30	2,7
> 80	739	0,7	80	0,73	22	0,46	8	0,72
Total	104.723 (86,2%)	100	10.933 (9%)	100	4.738 (3,9%)	100	1.107 (0,9%)	100

Fonte: SINAN 2014

Figura 2 - Distribuição dos óbitos e letalidade (=LET) nos tipos de acidentes ofídicos de acordo com a faixa etária (número totais de óbitos de 2009 a 2013).

Faixa Etária	Botrópico Óbitos %	Botrópico Let.	Crotálico Óbitos %	Crotálico Let.	Laquéutico Óbitos %	Laquéutico Let.	Elapídico Óbitos %	Elapídico Let.
< 1	3(0,76)	0,25	2(1,88)	1,73	1(3,44)	1,72	0(0)	0
1-4	10(2,57)	0,54	1(0,95)	0,58	1(3,44)	1,36	0(0)	0
5-9	17(4,36)	0,33	6(5,66)	1,28	1(3,44)	0,34	0(0)	0
10-14	25(6,42)	0,27	6(5,66)	0,84	3(10,36)	0,57	1(33,33)	1,53
15-19	13(3,33)	0,12	7(6,6)	0,77	0(0)	0	0(0)	0
20-39	101(25,9)	0,27	17(16,04)	0,45	14(48,3)	0,77	1(33,33)	0,22
40-59	134(34,36)	0,45	34(32,08)	0,97	5(17,26)	0,46	0(0)	0
60-64	26(6,66)	0,59	6(5,66)	1,21	1(3,44)	0,6	1(33,33)	2,22
65-69	11(2,83)	0,38	6(5,66)	1,56	1(3,44)	0,96	0(0)	0
70-79	40(10,25)	1,44	13(12,26)	3,46	1(3,44)	1,05	0(0)	0
e"80	10(2,56)	1,35	8(7,55)	10	1(3,44)	4,54	0(0)	0
Total	390 (100)	0,37	106 (100)	0,96	29 (100)	0,61	3 (100)	0,27

Fonte: SINAN 2014

1.2 ACIDENTES CROTÁLICOS

As serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascavéis, ou cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, tem hábitat característico de áreas de campos abertos, áreas secas, arenosas, pedregosas, e raramente estas serpentes habitam a faixa litorânea, e também não se encontram em ambientes de florestas ou do Pantanal. Estas serpentes se caracterizam por possuírem na calda um guizo, que quando excitadas, denunciam sua presença por um ruído característico.

Das serpentes do gênero *Crotalus*, a espécie *Crotalus durissus* é a mais amplamente distribuída no Brasil. São encontradas no país 5 subespécies: *C. d. cascavella*, em regiões secas do Nordeste brasileiro e extremo nordeste de Minas Gerais; *C. d. collilineatus*, no Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e sul do Brasil; *C. d. marajoensis*, nos campos da Ilha de Marajó; *C. d. ruruima*, na região do cerrado do estado de Roraima; *C. d. terrificus*, em Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (Pinho, Pereira, 2001; Guidolin et al, 2013).

Destas subespécies a mais importante é a *C. d. terrificus*, já que é a que apresenta um maior número de acidentes e a que tem seu veneno utilizado para produção de soro-anticrotálico (Carvalho, 2010). O veneno desta subespécie possui cinco proteínas farmacologicamente ativas: convulsina, delta-toxina, giroxina, crotocina e crotamina (Barroset et al, 2015).

Como mencionado anteriormente, os acidentes crotálicos apresentam um alto índice de letalidade quando comparados aos outros gêneros brasileiros. Quanto a letalidades, 72% dos casos ocorrem devido a falta

de tratamento adequado nestes acidentados, ou seja, não terem sido realizados o com soro específico (soro anticrotálico), no entanto 11% dos casos chegam ao óbito mesmo tratados adequadamente (Rosenfeld, 1991).

De uma maneira geral, o veneno crotálico é caracterizado por quase não produzir lesão local e possuir principalmente três atividades com importância clínica conhecida. A atividade neurotóxica, com ação periférica, causando paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente ocular, facial e às vezes, da respiração, com consequente insuficiência respiratória; atividade coagulante provocando a ocorrência de sangramento e distúrbios da coagulação por consumo de fibrinogênio e atividade miotóxica sistêmica, causando rabdomiólise generalizada, podendo evoluir para insuficiência renal aguda (Cheymol et al, 1971; Chang, Tseng, 1978; Vital Brazil et al, 1979; Chávez-Olortegui et al, 1997; Pardal et al, 2007).

A ação neurotóxica é causada principalmente pela crotóxina, que atua nas junções pré-sinápticas tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. Inibe a liberação de acetilcolina, sendo este o fator com maior participação no bloqueio neuromuscular, causando paralisia motora ou respiratória no paciente. Já a convulsina e a giroxina contribuem para o surgimento de convulsões e alterações circulatórias e respiratórias (Barrio 1961; Vital et al, 1966; Vital 1980; Ribeiro et al, 2012).

A ação miotóxica é responsável por lesões de fibras musculares esqueléticas essencialmente as do tipo I, podendo causar rabdomiólise intensa, com liberação de enzimas e mioglobina para o soro, seguida de excreção urinária desse pigmento, levando à mioglobinúria. Provavelmente as frações responsáveis por essa ação miotóxica são a crotamina e a crotóxina (Rosenfeld, 1965; Cupoet al, 1990; Jorge, Ribeiro, 1990; Pinho et al, 2000; Riella, 2003; Ribeiro et al, 2012).

A ação coagulante provoca distúrbios de coagulação que ocorrem em aproximadamente 40% das vítimas (Silveira; Nishioka 1992; Ribeiro et al, 2012). Geralmente não há redução no número de plaquetas. Essencialmente decorre de atividade do tipo trombina, responsável pela conversão do fibrinogênio diretamente em fibrina. O consumo do fibrinogênio (hipofibrinogenemia) pode levar a uma incoagulabilidade sanguínea completa ou parcial de pacientes vítimas de acidente crotálico. Um fator agregante plaquetário também foi isolado de veneno de algumas espécies de *Crotalus*, porém trombocitopenia é raramente

detectada nos pacientes (Kamiguti,Cardoso, 1989; Sano-Martins et al, 2001).

Portanto, a Crotoxina e a Crotamina são as duas principais toxinas do veneno crotálico, porque estas desencadeiam quase todos os sintomas do envenenamento. Desta forma, a seguir, a crotoxina e a crotamina foram detalhadas uma vez que correspondem às toxinas de interesse neste estudo.

1.3 CROTOXINA

A crotoxina é o principal componente tóxico do veneno *da Crotalus durissus terrificus*, representando cerca de 70% de sua massa total. Foi a primeira neurotoxina animal a ser purificada e cristalizada (Slotta, Fraenkel-Conrat, 1938; Gomes et al, 2007). É formada por duas subunidades associadas de forma não covalente: a de atividade fosfolipásica, fosfolipase A₂(PLA₂), sendo uma subunidade básica com massa molecular de 14 kDa; e a crotapotina, uma subunidade ácida, com massa molecular de 9,2 kDa (Faure, Bon, 1988; Ribeiro et al, 2012).

A subunidade da PLA₂ da crotoxina é a responsável pelo efeito neurotóxico, sua função fisiopatológica é responsável por inibir a transmissão neuromuscular, bloqueando a liberação de acetilcolina (ACh). (Hortnagel, Hanin, 1992; Ribeiro et al, 2012). Em adição aos seus efeitos pré-sinápticos, a crotoxina também age de forma pós-sináptica bloqueando a resposta à ACh ao manter o receptor colinérgico em um estado conformacional inativo (Vital Brazil; Excell, 1971; Vital Brazilet al, 1966; Hanley, 1979; Bonet al, 1979; Faure, Bon, 1988; Gomes et al, 2007; Ribeiro et al, 2012).

A atividade da crotoxina depende do sinergismo entre as duas subunidades, sendo que a crotapotina age como proteínas chaperonas, inibindo ligações inespecíficas da PLA₂e potencializando a sua ação neurotóxica (Bonet al 1989; Hernandez-Oliveira et al, 2005). Alguns estudos demonstraram que a subunidade da crotapotina, isolada do complexo crotoxina, também pode apresentar alguma atividade biológica, como por exemplo, a inibição da resposta inflamatória à carragenina em edema na pata traseira de ratos (Landucci et al, 1995; Oliveira et al, 2003; Oliveira, 2010).

1.4 CROTAMINA

A crotamina foi primeiramente isolada, por meio de métodos

eletroforéticos, por Gonçalves e Vieira (1950). Possui massa molecular de 4,8 kDa e é composta por 42 aminoácidos (Laure, 1975), apresentando, dentre outros resíduos, sete resíduos de aminoácidos aromáticos: 1 Tirosina, 2 histidina, 2 triptofanos e 2 fenilalaninas. É uma toxina extremamente básica, com ponto isoelétrico (pI) = 10.3 (Gonçalves, 1956) devido à presença de 11 aminoácidos básicos (9 lisinas e 2 argininas). Estes aminoácidos promovem uma superfície carregada positivamente (Kerkiset al, 2014). A toxina é estabilizada por seis cisteínas ligadas, fazendo três pontes dissulfeto, fato que confere à crotamina alta estabilidade conformacional (Hampe et al, 1978). O N-terminal possui uma tirosina e o C-terminal, uma glicina (Boni-Mitakeet al, 2001). A crotamina é potencialmente menos tóxica que a crotalina, porém, sua ação é específica sobre a membrana muscular esquelética, provocando estado de fibrilação com contrações curtas e relaxamento demorado (Lago et al, 2003). A crotamina é também uma miotoxina responsável pelanecroseno tecido muscular e paralisia espasmódica em músculos de origem periférica através da despolarização do potencial de membrana das células musculares e quando em baixas concentrações pode induzir analgesia (Cunha, Martins, 2012).

Gonçalves e Arantes (1956) mostraram que a quantidade de crotamina no veneno de cascavel é extremamente variável perfazendo de 9,6 a 53,7% do veneno total. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada com o habitat e alimentação da serpente. Assim, a constituição do veneno de *C.d.terrificus* devido à presença de crotamina pode ser denominada crotamina-positivo ou crotamina-negativo. As serpentes que possuem venenos crotamina-positivo podem ser encontradas ao oeste do Estado de São Paulo e os venenos crotamina-negativo, ao leste do Estado, tendo ainda uma região que é híbrida, na qual coexistem ambos os tipos de veneno (Schenberg, 1959; Oguiura, 1998; Oliveira, 2010).

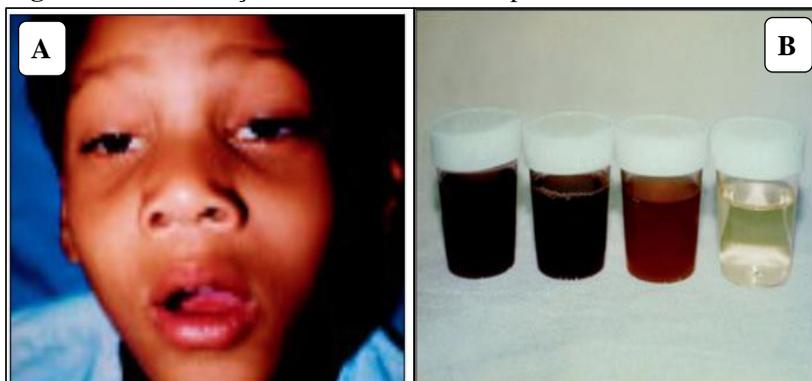
1.5 ENVENENAMENTO COM SERPENTES DO GÊNERO CROTALUS

O envenenamento pelas serpentes do gênero *Crotalus* é caracterizado por apresentar diversas manifestações locais e sistêmicas. O quadro clínico local é caracterizado por manifestações discretas como dor, eritema, edema, e parestesia local ou regional. O quadro sistêmico é apresentado por mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos, sonolência ou inquietação e sensação de boca seca, que podem aparecer

precocemente (Pinho,Pereira, 2001). Também como já relatado, o envenenamento sistêmico é caracterizado, principalmente, pela atividade neurotóxicapré e pós-sináptica de algumas toxinas na junção neuromuscular. Essa atividade leva com o bloqueio da liberação da acetilcolina na fenda sináptica e a competição das neurotoxinas pelos receptores colinérgicos na placa terminal, provocando uma síndrome miastênica aguda (fáciesmiastênica). Nesta situação clínica é possível observar ptose palpebral uni ou bilateral (Figura 3A), midríase bilateral semiparalítica, visão turva e/ou diplopia e flacidez da musculatura da face (FUNASA, 2001; Secretaria da Saúde do Paraná, 2017).

A miototoxicidade do veneno é evidenciada por intensa mialgia generalizada, que pode ser acompanhada por discreto edema muscular. A fibra muscular esquelética lesada libera quantidades variáveis de mioglobina que é excretada pela urina, mostrando um quadro clássico de mioglobinúria que confere uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura, podendo chegar até à uma coloração amarronzada (Figura 3B). Este quadro pode levar a uma incoagulabilidade sangüínea ou a um aumento do tempo de coagulação com queda de fibrinogênio em aproximadamente 40% dos pacientes, observando-se em alguns casos gengivorragia. Os casos mais graves desse tipo de acidente podem levar a insuficiência renal aguda, com necrose tubular, o que pode levar a vítima ao óbito. Geralmente as primeiras 48 horas são as mais importantes(FUNASA, 2001; Pinho; Pereira, 2001; Secretaria da Saúde do Paraná, 2017).

Figura 3 -Manifestações do envenenamento por *Crotalus*.



Em **A**: um acidente grave de umacriança de seis anos, atendida três horas após a picada, apresentando sinal clássico de ptose palpebral bilateral. Em **B**: uma série

de coleta de urina sequencial entre a admissão e 48 horas após o acidente apresentando a diurese escurecida com mioglobínúria (Fotos: F. Bucarechi).
Fonte: FUNASA, 2001.

1.6 TRATAMENTO

O tratamento atualmente preconizado pelo Ministério da Saúde para acidentes com animais peçonhentos é o soro antiveneno, o qual é um imunobiológico utilizado no tratamento de intoxicações causadas pelo veneno destes animais ou por outras toxinas, possuindo anticorpos capazes de neutralizar o efeito tóxico dos venenos. Os antivenenos são considerados a forma mais eficaz de neutralização da peçonha, sendo este o tratamento também recomendado pela OMS.

No Brasil, há mais de 100 anos, estes soros são produzidos por meio da metodologia de hiperimunização de cavalos (Silva, 2013). Desde o desenvolvimento do primeiro antiveneno por Calmette em 1894, a produção não teve grandes evoluções e o princípio básico ainda continua o mesmo: injeções com o veneno bruto, em cavalos, devido a grande quantidade de sangue que pode ser obtida, fácil manuseio e criação em áreas tropicais (Chippaux, 2013). Atualmente, este procedimento é realizado no país por quatro instituições nacionais: o Instituto Butantan, em São Paulo; a Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte; o Instituto Vital Brazil, no Rio de Janeiro e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, em Curitiba. Essas instituições são responsáveis por repassar todos os antivenenos ao Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O soro anticrotálico (SAC) é o soro produzido a partir da hiperimunização de cavalos com uma mistura de veneno da espécie *Crotalus durissus* procedente de diferentes regiões do país. O SAC é constituído de imunoglobulinas heterólogas (IgG), obtidas a partir do plasma destes cavalos sadios hiperimunizados, purificadas e digeridas por digestão enzimática (pepsina) não pirogênica. A digestão ocorre para que as IgG's percam a sua porção Fc, já que elas são responsáveis pela ativação do sistema do complemento pela via clássica, o que poderia gerar reações adversas. Obtêm-se, então, uma molécula mais pura e menos reatogênica quanto a efeitos de natureza alérgica (ANVISA, 2017).

A soroterapia recomendada varia de acordo com a gravidade do acidente, independente da idade, peso e massa corporal, devendo-se ressaltar que a quantidade a ser ministrada à criança é a mesma do

adulto. Os casos podem ser leve, moderado ou grave. A classificação da gravidade do acidente está relacionada com as manifestações clínicas apresentadas (tabela 1).

O SAC deve ser preferencialmente inoculado por via intravenosa e ser diluído em solução fisiológica a 0,9% ou solução glicosada a 5% na proporção de 1:2 a 1:5, infundindo-se na velocidade de 8 a 12 mL/min. Nos casos em que se tem dúvida se o acidente é botrópico ou crotálico ou quando não se tem o SAC, deve ser utilizar o SABC (soro antibotrópico-crotálico) produzido pela mistura dos venenos do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (FUNASA, 2001; ANVISA, 2017).

Tabela 1: Tratamentos recomendado em caso de acidentes as serpentes do gênero *Crotalus*

Classificação	Manifestações Clínicas	Soroterapia (nº de frascos-ampolas)
Leve	- Fácies miastênicase visão turva tardias; - Mialgia discreta ou ausente; - Mioglobínúria ausente.	5
Moderado	- Fácies miastênicase visão turva discretas; - Mialgia discreta; - Mioglobínúria pouco evidente.	10
Grave	- Fácies miastênicase visão turva evidentes; - Mialgia intensa; - Mioglobínúria presente; - Oligúria presente.	20

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2017.

1.7 INTERAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO

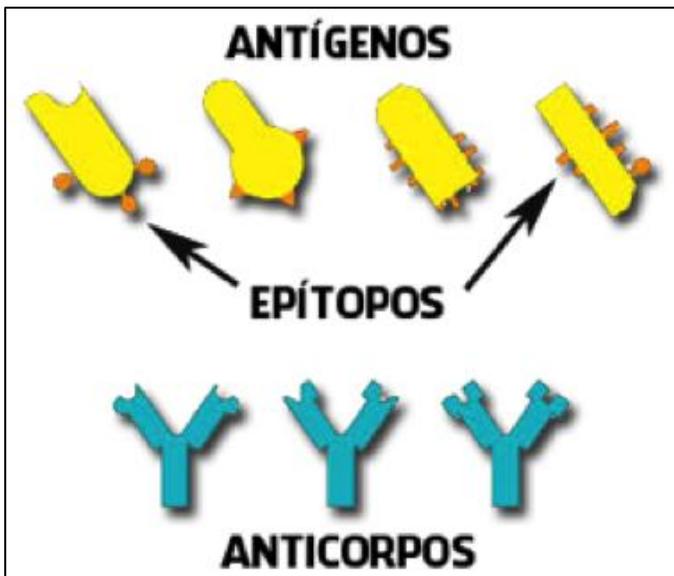
1.7.1 Epítomos

Buscando compreender a forma do mecanismo de ligação antígeno-anticorpo, vários estudos surgiram descrevendo as características estruturais dos anticorpos e antígenos e caracterizando seus epítomos, também conhecidos como determinantes antigênicos. Epítomos são as regiões do antígeno capaz de interagir com o anticorpo induzindo uma

resposta imunológica. Eles podem ser classificados como conformacionais, ou seja, corresponderem a sítios da proteína compostos por segmentos proteicos descontinuados na sequência de aminoácidos do antígeno que foram aproximados pelo dobramento proteico, ou então, como lineares, sendo compostos por um único fragmento da cadeia peptídica (Kenneth, Murphy, Travers, 2010).

Enquanto os anticorpos possuem um único tipo de receptor, os antígenos podem possuir vários epítopos, pois na maioria das vezes, essa estrutura é formada por carboidratos ou proteínas (Parham, 2011,). A região do anticorpo que se liga ao antígeno é denominada de paratopo. Dessa forma, as interações antígeno-anticorpo, ilustrada na figura 4, são realizadas quando o paratopo do anticorpo se liga ao epítipo do antígeno (Van-Regenmortel, 2001).

Figura 4-Ilustração de um epítipo específico de um antígeno que interage com o paratopo de um anticorpo.



Fonte: Biomedicina brasil.

(<http://www.biomedicinabrasil.com/2013/11/interacoes-antigeno-anticorpo.html>)

1.7.2. Mapeamento de Epítomos

O método mais adequado para encontrar um epítopo é resolver a estrutura 3D do complexo antígeno-anticorpo, geralmente utilizando-se a cristalografia de raios-X, métodos imunquímicos ou através de ferramentas de bioinformática (Machado-de-Ávila, 2011; Santos, 2012). Apesar de gerar um resultado mais preciso, a técnica de cristalografia requer a utilização da proteína com alto grau de pureza e em grande quantidade, o que torna este método de elevado custo financeiro e de difícil obtenção dos resultados (Machado-de-Ávila, 2011). Deste modo, a identificação de epítomos por programas de computador é uma alternativa economicamente mais viável, pois requer apenas um computador e conhecimentos básicos sobre proteínas, e não necessita da proteína. Para prever a localização dessas regiões ou epítomos antigênicos utilizam-se algoritmos baseados em diferentes características físico-químicas da proteína alvo como: hidrofobicidade, acessibilidade, flexibilidade e a estrutura secundária da proteína (Pellequer, Westhof, 1993).

1.8 BIOINFORMÁTICA

O foco da bioinformática é o desenvolvimento e a aplicação de técnicas em computação. Algumas pesquisas são realizadas utilizando-se o alinhamento de sequências, desenho de fármacos, interação proteína-proteína, busca de genes, predição de estruturas das proteínas, montagem de genoma entre outros. É um campo interdisciplinar que abrange a ciência da computação, matemática, física e biologia, sendo essencial para biologia e medicina moderna (Bayat, 2002).

Uma das ferramentas da bioinformática são os bancos de dados, ou seja, um conjunto de dados criados a fim de organizar as informações de modo a facilitar as consultas, atualizações e as deleções desses dados. Os bancos de dados permitem consultar as sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos (proteínas), além das estruturas de proteínas, expressão gênica e publicações. Dentre os principais bancos de sequências de ácidos nucleicos, aminoácidos ou de estrutura de proteínas estão o Genbank e o PDB (banco de dados de proteínas, do inglês: *Protein Data Bank*) (Santos, 2012).

Na bioinformática o alinhamento de sequências é uma ferramenta básica, é um método de comparação que tem por finalidade determinar o grau de similaridade entre as sequências (Santos, 2012). Similaridade e

homologia são termos diferentes. A similaridade está entre a semelhança e a diferença, independente da origem. Já a homologia significa que as sequências descendem de um ancestral comum (Lesk, 2008). Essa ferramenta permite estabelecer a identidade entre as sequências, definir domínios e funções proteicas, identificar similaridade com segmentos de peptídeos e acompanhar a evolução das proteínas. Os alinhamentos podem ser globais ou locais; o alinhamento global é aquele que possui os resíduos de uma sequência alinhados a todos os resíduos de uma outra sequência. Já o alinhamento local, procura encontrar uma região, em determinada sequência que se alinhe a uma região de outra sequência. Um programa muito utilizado para essa busca é o BLAST (ferramenta básica de busca de alinhamentos locais, do inglês: Basic Local Alignment Search Tool) (Thompson et al, 1994).

O conhecimento da estrutura terciária de uma proteína é extremamente importante para identificar sua função, pois permite a observação de domínios, como os sítios catalíticos. Possibilitando também o uso dessa estrutura para pesquisas mais direcionadas (Maggio, Ramnarayan, 2001). Existem estruturas tridimensionais já conhecidas que são depositadas no PDB, no entanto um método considerado comparativo como a modelagem por homologia, permite realizar a predição da estrutura tridimensional de uma proteína a partir das estruturas terciárias já conhecidas. Esse método se baseia na similaridade sequencial entre as proteínas, possibilitando a construção do modelo 3D (Kopp, Schwede, 2004). Deste modo, grande parte da proteína alvo será parecida com a proteína que possui a estrutura conhecida, servindo de molde para a construção do modelo tridimensional. Essa construção pode ser realizada por alguns *softwares* como o SWISS-MODEL (Schwede et al, 2003).

De acordo com Santos (2002), para a realização da modelagem por homologia todas as etapas do processo devem ser seguidas: seleção da proteína que servirá como molde; alinhamento das sequências entre proteína alvo e molde; construção e validação do modelo tridimensional, uma vez que cada etapa envolve métodos e programas específicos.

O *Sting Millennium* é uma base de dados disponível na internet que possibilita realizar a predição de epítomos conformacionais, pois proporciona uma visualização e uma análise complexa da sequência molecular e da estrutura para os dados que são depositados no PDB (Higa et al, 2004). O *STING* foi projetado para descrever a relação entre a sequência, estrutura e a função da proteína (Neshich et al, 2003) e dessa forma é possível avaliar parâmetros físicos-químicos e biológicos

da proteína analisada (Borro et al, 2006). Tais combinações de parâmetros estão disponíveis em um único local, o *Java Protein Dossier* (JPD) (Neshich et al, 2004). O JPD é um módulo do *STING*, que proporciona uma das maiores coleções de parâmetros físicos-químicos que descrevem a estrutura, estabilidade, função e a interação de proteínas com outras macromoléculas, reunidas como ferramentas de visualização. Dessa forma, ao coletar um número maior de parâmetros dentro de um mesmo banco de dados, possibilita uma melhor utilização das informações disponíveis. Além disso, o agrupamento de dados nos permite gerar diferentes parâmetros com potencial de fornecer novas análises individuais na relação sequência-estrutura-função de uma proteína. No JPD as escolhas dos resíduos podem ser realizadas de acordo com diversos critérios (Neshich, 2004).

Diversas pesquisas atualmente aplicam ferramentas de bioinformática para encontrar moléculas chaves (peptídeos) que possam vir a substituir o uso de proteínas completas, que realizam a mesma função, sem as desvantagens da proteína, como exemplo a potencialidade de ausência de toxicidade. Cabe salientar que a substituição da proteína por peptídeo é vantajosa porque os peptídeos são mais fáceis de produzir, sua síntese é economicamente mais viável, e menos complexa; são mais estáveis, menores e mais flexíveis do que as proteínas; não são infecciosos e geralmente não são tóxicos.

Neste sentido, o presente trabalho realizou a predição e caracterização de epítomos conformacionais da crotocina e crotamina, as duas principais proteínas do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. A partir desta predição foram propostos dois peptídeos formados pela composição de aminoácidos de cada um destes epítomos conformacionais. Estes peptídeos foram testados quanto a sua capacidade de gerar uma resposta imune contra o veneno, a partir da produção de anticorpos policlonais específicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Predizer e caracterizar epítomos conformacionais da crotoxina e crotamina, duas principais proteínas tóxicas do veneno da serpente *Crotalus durrisus terfficus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Encontrar as estruturas 3D resolvidas no banco de dados PDB;
- II. Predizer epítomos conformacionais utilizando programas de Bioinformática;
- III. Desenhar um peptídeo para cada uma das proteínas utilizando os aminoácidos preditos como epítomo conformacional;
- IV. Sintetizar os peptídeos desenhados utilizando a técnica de FMOC-Sínteses;
- V. Imunizar camundongos com os peptídeos sintetizados afim de obter anticorpos policlonais;
- VI. Validar os peptídeos como epítomos conformacionais por ensaios sorológicos imunoenzimático utilizando os anticorpos policlonais produzidos e por neutralização *in vivo*.

3 METODOLOGIA

3.1 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

3.1.1 Bancos de Dados

As estruturas de proteínas estudadas neste trabalho já são resolvidas e estão cadastradas no banco de dados online, o *Protein Data Bank* (PDB), para a obtenção de suas estruturas tridimensionais utilizou-se no site do PDB, as palavras-chaves “*crotoxin AND crystal*” para obter a estrutura da crotoxina e “*crotamine AND crotalus*” para obter a estrutura da crotamina. Nos casos em que a busca apresentava mais de uma estrutura, selecionou-se a estrutura que estivesse completa e que apresentasse uma melhor resolução (resolução de menor Angström). As estruturas foram então salvas em formato .pdb e os seus códigos de acesso ao PDB anotados para experimentos seguintes.

3.1.2 Predição de epítomos conformacionais

Para realizar a predição dos epítomos conformacionais da crotamina e da crotoxina utilizou-se alguns programas de bioinformática anteriormente descritos, o *Sting Millennium*, e seu módulo JPD. Para isto, seguiu-se a metodologia descrita por Machado-de-Ávila et al, 2014. A partir dos códigos de PDB encontrado no item 3.1.1 o programa calculou os parâmetros físicos-químicos e biológicos de cada proteína e retornou numa janela do JPD. Para cada proteína, selecionou-se os aminoácidos que apresentavam maior acessibilidade ao solvente.

3.1.3 Designo Peptídeo

Após a seleção dos aminoácidos, estes foram manualmente localizados na estrutura 3D de suas proteínas com o auxílio do *SwissPDBViewer* (Guex, Peitsch, 1997). A partir dessa localização, um peptídeo foi proposto para cada proteína, baseando-se na distância entre os resíduos de aminoácidos determinados e os resíduos de aminoácidos espaciais vizinhos (Machado-de-Ávila et al, 2014).

3.2 SÍNTESE SOLÚVEL DE PEPTÍDEOS

O peptídeo selecionado como epítomo conformacional para cada

proteína foi sintetizado utilizando-se um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina), que utiliza aminoácidos especiais para a realização da síntese *in vitro*. Esse protocolo foi executado de acordo com Merrifield (1969) e Machado-de-Ávila (2011).

Esse método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Esses aminoácidos possuem um grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil-metil-oxicarbonila) e sua cadeia lateral também é protegida para evitar possíveis reações indesejadas. Cada etapa onde é adicionado um aminoácido ou feita a desproteção de um grupamento protetor, pode-se monitorar pelo teste de Kayser, identificando as aminas livres (Vogel, 1948).

A síntese é realizada em uma seringa contendo a resina e tem início com a adição de dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Em seguida é adicionado a 4-metil-piperidina 25% em DMF por 20 minutos para eliminar o Fmoc da resina, e então são realizadas três lavagens com DMF e uma lavagem com Diclorometano (DCM). Faz-se o teste de Kayser para confirmar a desproteção e dá-se início a etapa de acoplamento. Nessa etapa o primeiro aminoácido a ser acoplado é adicionado juntamente com os ativadores da função carboxila, a Oxyma e o DIPC (Diisopropilcabodiimida), e são deixados por no mínimo 30 minutos na seringa para que ocorra a ligação peptídica do aminoácido adicionado. Após a acoplagem, duas novas lavagens intercaladas com DMF e Metanol são realizadas seguidas de uma lavagem com DCM, monitora-se o acoplamento com teste de Kayser e então é iniciada a etapa de desproteção. Nessa etapa o grupamento Fmoc do aminoácido acoplado é removido com a adição de 4-metil-piperidina 25 % em DMF por 20 minutos e com as lavagens de DMF e DCM, e segue-se para a acoplagem do segundo aminoácido.

Esse ciclo de acoplagem/desproteção é realizado até que todos os aminoácidos do peptídeo sejam acoplados. Após o último aminoácido ser acoplado, agora sem o grupamento Fmoc dando fim aos ciclos, o peptídeo é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem, onde acontece a eliminação dos grupamentos protetores da cadeia lateral. Para isso o peptídeo é incubado por três horas com uma solução de clivagem contendo 2,5% de TES (Trietililsilano), 2,5% de água destilada e 95% de TFA (Ácido Trifluoracético). Após esse período filtra-se o conteúdo recolhendo a solução em um tubo falcon e adiciona-se 20 mL de éter etílico gelado (~ 4°C), para precipitar o peptídeo,

formando uma emulsão esbranquiçada. O peptídeo é separado do éter por centrifugação por 10 minutos em 4°C a 10000 rpm.

Posteriormente, o peptídeo foi liofilizado em duas etapas: congelamento em um ultrafreezer a -75°C durante 24 horas e liofilização em uma pressão de 80mmHg com o condensador mantido a -75°C por 24 horas.

Para a utilização do peptídeo nas imunizações e no ELISA, ele foi polimerizado, via glutaraldeído, onde 10mg dos peptídeos liofilizados foram diluídas em uma solução com 500µL de PBS e 500µL de glutaraldeído 1% por 1 hora a 4°C e sob constante agitação, estabelecendo uma concentração final de 10mg/mL (Machado-de-Ávila et al, 2004).

3.3 IMUNIZAÇÕES

Para realizar as imunizações foram utilizados camundongos da linhagem Swiss pesando (20 ± 2) g. Estes animais foram provenientes e mantidos no Centro de Experimentação Animal (Biotério) da UNESC e receberam água e alimentação de maneira *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo a utilização desses animais passaram por aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) sob protocolo de número 080/2016-1, alinhado à Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e às normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Este protocolo 080/2016-1 pode ser consultado no Anexo A.

Foram utilizados 16 camundongos divididos em quatro grupos:

(G1) Grupo controle positivo - veneno (4 camundongos): Os animais receberam injeções subcutâneas de veneno da *C. durissusterrificus* à 1,25mg/kg (valor correspondente à ¼ da DL-50¹. O valor de 1 DL-50 para o veneno de *C. durissusterrificus*, pela via subcutânea é de 5,0 mg/kg (Magalhães et al 2001)) em PBS e adjuvante de Freund's;

(G2) Grupo controle negativo BSA (4 camundongos): Os animais receberam injeções subcutâneas de BSA à 1,25 mg/kg em PBS e adjuvante de Freund's;

(G3) Grupo experimental crotamina (4 camundongos): Receberam injeções subcutâneas com 2,5 mg/kg do peptídeo sintético da crotamina em PBS e adjuvante de Freund's;

¹ DL50 = dose Letal capaz de matar 50% dos animais

(G4) Grupo experimental crotoxina (4 camundongos): Receberam injeções subcutâneas com 2,5 mg/kg do peptídeo sintético da crotoxina em PBS e adjuvante de Freund's.

Todos os grupos receberam semanalmente reforços com novas imunizações durante os 70 dias posteriores a primeira injeção, totalizando 10 reforços. Sete dias após o último reforço, os animais tiveram mais uma vez seu sangue coletado e após duas centrifugações a 4 °C, 12.000 rpm por dez minutos, a obtenção do seu soro (soros anti-peptídeos, antiveneno ou anti-BSA). Os soros foram armazenados à -20°C para os ensaios de ELISA.

3.4 TESTE SOROLÓGICOIMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para testar a produção de anticorpos e assim confirmar se os peptídeos da crotoxina e crotamina são epítomos, foi realizado o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*). O ensaio ELISA baseia-se na reação antígeno-anticorpo e foi realizado conforme Chávez-Olórtegui et al (2001): as placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL do veneno bruto de *C.durissusterrificus* à 1,0 µg/poço ou com cada peptídeo à 10 µg/poço, todos diluídos em tampão de sensibilização (Bicarbonato de Sódio, pH de 9,6) mantidos *overnight* à 4°C. Após, a placa foi bloqueada com 250µL de solução de bloqueio contendo caseína à 2%. Em seguida, incubou-se os soros dos animais obtidos das imunizações em uma diluição de 1:100 em solução de tampão de incubação. Por fim, utilizou-se como anticorpo secundário o anti-IgG de camundongo-peroxidase na diluição de 1:4000 em tampão de incubação e revelou com o substrato OPD (ortofenildiamina) e peróxido de hidrogênio. Os valores das absorbâncias foram determinados a 492nm com utilização de espectrofotômetro UV-VIS de placa. Resultados foram expressos como a média dos valores.

3.5 ANÁLISE DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

Com o intuito de verificar a capacidade dos anticorpos produzidos serem capazes de neutralizar o veneno da serpente *C.durissusterrificus*, realizou-se os ensaios de neutralização *in vivo* como descrito por Machado-de-Ávila et al(2011). Ao final das imunizações, todos os 16 camundongos receberam uma injeção do veneno de *C.durissusterrificus* diluído em PBS na dosagem de 10 mg/kg, valor equivalente à duas DL50. As doses foram injetadas por via subcutânea e

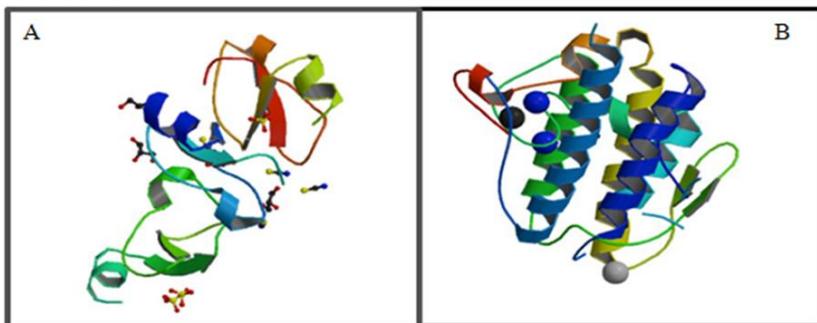
os animais observados por duas horas e a mortalidade contabilizada após 48h.

4.RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

As duas proteínas deste estudo constituem os principais componentes tóxicos do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. A busca pela estrutura 3D da crotamina a partir das palavras chaves “*crotamine AND crotalus*” retornou três resultados. Dos três, apenas um apresentava a estrutura completa resolvida, a estrutura de código de identificação 4GV5 e resolução de 1.7Å determinada por cristalografia em raios-X (figura 5A). A partir das palavras chaves “*crotoxin AND crystal*” obteve-se duas estrutura para a crotoxina. A estrutura que apresentava melhor resolução foi a de código de identificação 3R0L e resolução de 1.35 Å, também obtida a partir da cristalografia em raios-X, cadastrada no PDB (figura 5B).

Figura 5 -Estrutura tridimensional da Crotamina (código do PDB: 4GV5) e Crotoxina(código do PDB: 3R0L) obtida após busca no banco de dados do PDB.



Em **A**, a estrutura da crotamina e em **B**, a estrutura da crotoxina.

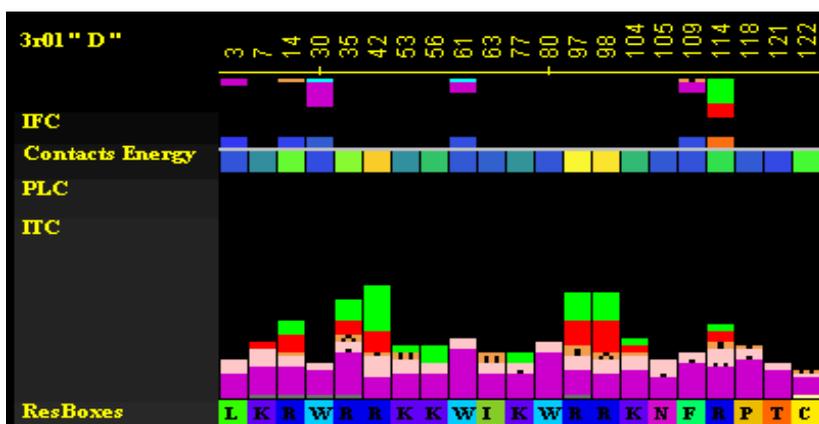
Fonte:PDB, 2017.

4.2 PREDIÇÃO, DESIGNER E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Após a identificação das estruturas 3D no PDB, utilizou-se um módulo do programa *STING Millennium*, o *Java ProteinDossier (JPD)* para identificar os aminoácidos de cada toxina que possua alta possibilidade de pertencer a um epítipo conformacional. Assim, identificou-se os aminoácidos de cada proteína que apresentavam maior acessibilidade ao solvente.

A figura 6 ilustra os resultados obtidos para crotoxina (PDB:3R0L). Foram obtidos 21 aminoácidos. São eles L3, K7, R14, W30, R35, R42, K53, K56, W61, I63, K77, W80, R97, R98, K104, N105, F109, R114, P118, T121, C122. Já a figura 7 apresenta os aminoácidos identificados para a crotamina (PDB:4GV5), foram obtidos 16 aminoácidos, são eles: Y1, K2, H5, K6, K7, H10, K14, E15, I17, P21, K27, R31, W32, R33, K38, K39.

Figura 6 -Resultados da seleção dos aminoácidos mais acessíveis da Crotoxina(PDB: 3R0L)obtidos por JPD do *Sting millennium*.



Em *ResBoxes* estão os aminoácidos selecionados e acima a posição deles na estrutura primária. As cores são as representações de algumas das propriedades físico-química destes Aminoácidos e não foram levadas consideração neste trabalho.

Fonte: Adaptado dos resultados obtidos por meio do programa *Sting Millennium*

Figura 7-Resultados da seleção dos aminoácidos mais acessíveis da crotamina (PDB: 4GV5) obtidos pelo JPD do *Sting Millennium*.



Em *ResBoxes* estão os aminoácidos selecionados e acima a posição deles na estrutura primária. As cores são as representações de algumas das propriedades físico-química destes Aminoácidos e não foram levadas consideração neste trabalho.

Fonte: Adaptado dos resultados obtidos por meio do programa *Sting Millennium*.

Em seguida utilizou-se a ferramenta *SwissPDBViewer* para visualizar esses aminoácidos na estrutura tridimensional de sua respectiva toxina. Estes aminoácidos foram então destacados na coloração vermelha, como mostra a figura 8 para crotocina e a figura 9 para crotamina. O próximo passo foi procurar em cada estrutura, a região que continha o maior número de aminoácidos selecionados como prováveis epitopos. A determinação da região levou em consideração um diâmetro de 20 Å (tamanho médio do diâmetro de um paratopo de um anticorpo (Machado-de-Ávila et al, 2014). Ao fazer essa análise na crotocina, a região selecionada foi a composta pelos seguintes aminoácidos: L3, K7, W30, W61, I63. Já a região selecionada para crotamina é a região composta pelos aminoácidos Y1, K2, H5, K6, K7, G8, H10, K38, K39.

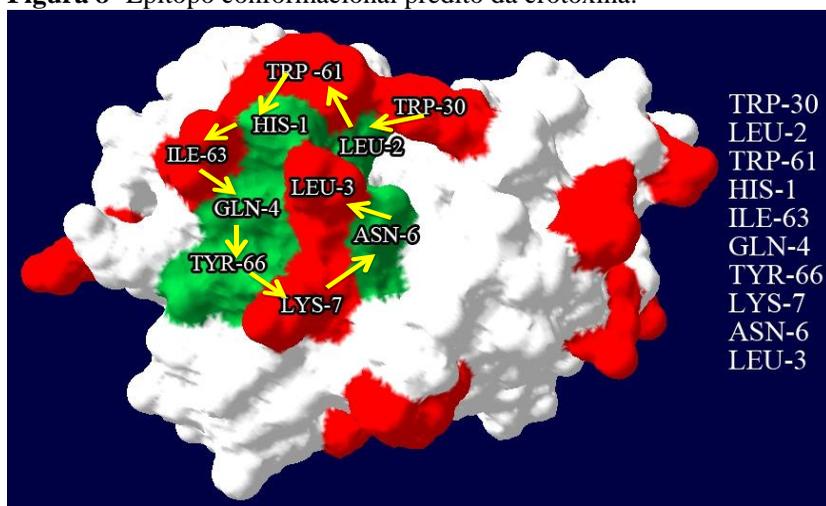
Após identificar as regiões dos epítomos, realizou-se manualmente o desenho de um peptídeo como descrito por Machado-de-Ávila et al (2014). Para isso, ligou-se os aminoácidos selecionados (figura 8 e figura 9 na cor vermelha) de acordo com sua proximidade na estrutura tridimensional. Quando necessário, utilizou-se de aminoácidos vizinhos espaciais (cor verde na figura 8 e figura 9) para realizar as ligações.

Assim dois peptídeos foram preditos, seguindo o sentido das setas das figuras 8 e 9, são eles:

Para a crotoxina o peptídeo proposto contém a seguinte sequência de dez aminoácidos: Trp-30, Leu-2, Trp-61, His-1, Ile-63, Gln-4, Tyr-66, Lys-7, Asn-6, Leu-3, logo o peptídeo-crotoxina possui a sequência de aminoácidos: WLWHINYKNL.

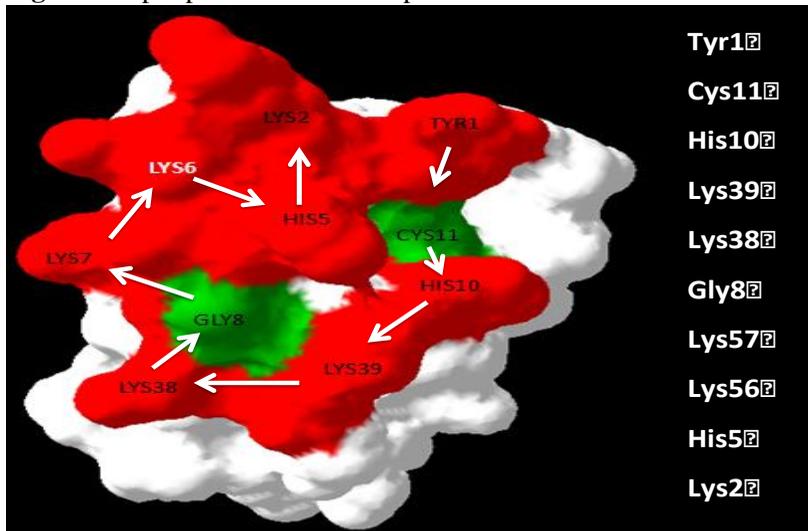
Para a crotamina, o peptídeo proposto também é formado por uma sequência de 10 aminoácidos, neste caso os aminoácidos são: Tyr1, Cys11, His10, Lys39, Lys38, Gly8, Lys7, Lys6, His5, Lys2, logo o peptídeo-crotamina possui a sequência de aminoácidos: YCHKKGKCHK.

Figura 8 - Epítipo conformacional predito da crotoxina.



Em vermelho, os aminoácidos selecionados pelo programa Sting Millennium e em verde, os aminoácidos utilizados para a ligação e formação do peptídeo. A seta mostra o sentido em que o peptídeo foi proposto. A estrutura 3D da crotoxina é apresentada no programa *SwissPDBviewer*.

Fonte: Do Autor

Figura 9 -Epítipo conformacional predito da Crotamina.

Em vermelho, os aminoácidos selecionados pelo programa Sting Millennium e em verde, os aminoácidos utilizados para a ligação e formação do peptídeo. O traçomostra o sentidoemque o peptídeofoi proposto. A estrutura 3D da crotamina é apresentada no programaSwissPDBviewer.

Fonte: Do Autor

4.3 SÍNTESES DE PEPTÍDEOS

A partir dos resultados da predição das sequências peptídicas dos epítipos conformacionais propostos para crotaxina e crotamina, seguiu-se para as sínteses destes dos peptídeos. Utilizou-se a técnica Fmoc (Merrifield, 1969; Machado-de-Ávila et al, 2011) a cada aminoácido da sequência dos peptídeos predito, peptídeo-crotaxina (WLWHIQYKNL) e peptídeo-crotamina (YCHKKGKKHK) foi adicionado sequencialmente em uma resina *rink-amide* (Sigma-Aldrich), via porção carboxi-terminal, sempre seguida por etapas de desproteção da porção amina-terminal. O sucesso nas adições dos aminoácidos e as desproteções da porção amina-terminal, sempre foram acompanhados pelo teste de identificação de amina livre (teste de Kayser), apresentando a cor amarela no teste para adição do aminoácido e azul para a etapa de desproteção. Ao final o peptídeo foi clivado da resina, precipitado com éter-etílico e após etapas de centrifugação e liofilização obteve-se o 80 mg de cada peptídeo para ensaios seguintes.

Estes peptídeos foram então utilizados para produção anticorpos em camundongos e para serem testados quanto a suas capacidades em neutralizar o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Para serem utilizados como imunógenos, cada peptídeo foi polimerizado, via glutaraldeído 1%, obtendo-se soluções estoque a 10mg/mL.

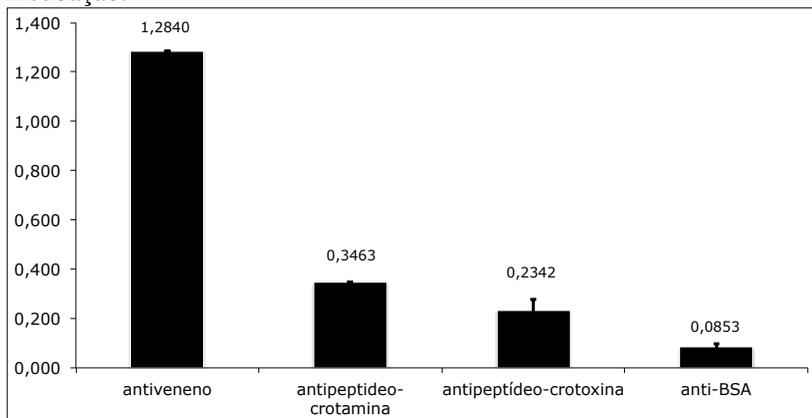
4.4 AVALIAÇÃO ANTIGÊNICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

De posse dos imunógenos e com a finalidade de verificar a capacidade antigênica de cada peptídeo, realizou-se semanalmente, durante um período de dez semanas, imunizações em camundongos, com 2,5 mg/kg de peptídeo-crotamina ou peptídeo-crotoxina e com auxílio de adjuvante de Freund's, por via subcutânea. Grupos controles também passaram por onze imunizações, porém com 1,25 mg/kg de veneno de *C. durissus terrificus* (controle positivo) ou BSA (controle negativo). Uma semana após a última imunização, o sangue dos animais foram coletados e centrifugados para obtenção dos soros de camundongos anti-peptídeo-crotamina, anti-peptídeo-crotoxina, antiveneno (controle positivo) ou anti-BSA (controle negativo).

De posse dos soros, o próximo passo foi verificar a capacidade imunogênica de cada anti-peptídeo produzido, a fim de comprovar a eficácia do peptídeo em mimetizar um epítipo. Para isso, ensaios de ELISA foram realizados sensibilizando as placas com veneno (figura 10) ou com os peptídeos (figura 11A para crotoxina e figura 11B para crotamina) e testando a reatividade destes com os soros produzidos.

Os resultados apresentados na figura 10 demonstram que ambos soros de camundongos anti-peptídeos produzidos foram reconhecidos pelo veneno de *C. d. terrificus*. A reatividade não é tão forte quanto o antiveneno (controle positivo), mas é significativamente maior que em relação ao controle negativo (anti-BSA), sendo três vezes maior para o soro de camundongo anti-peptídeo-crotoxina e quatro vezes maior para o soro de camundongo anti-peptídeo-crotamina.

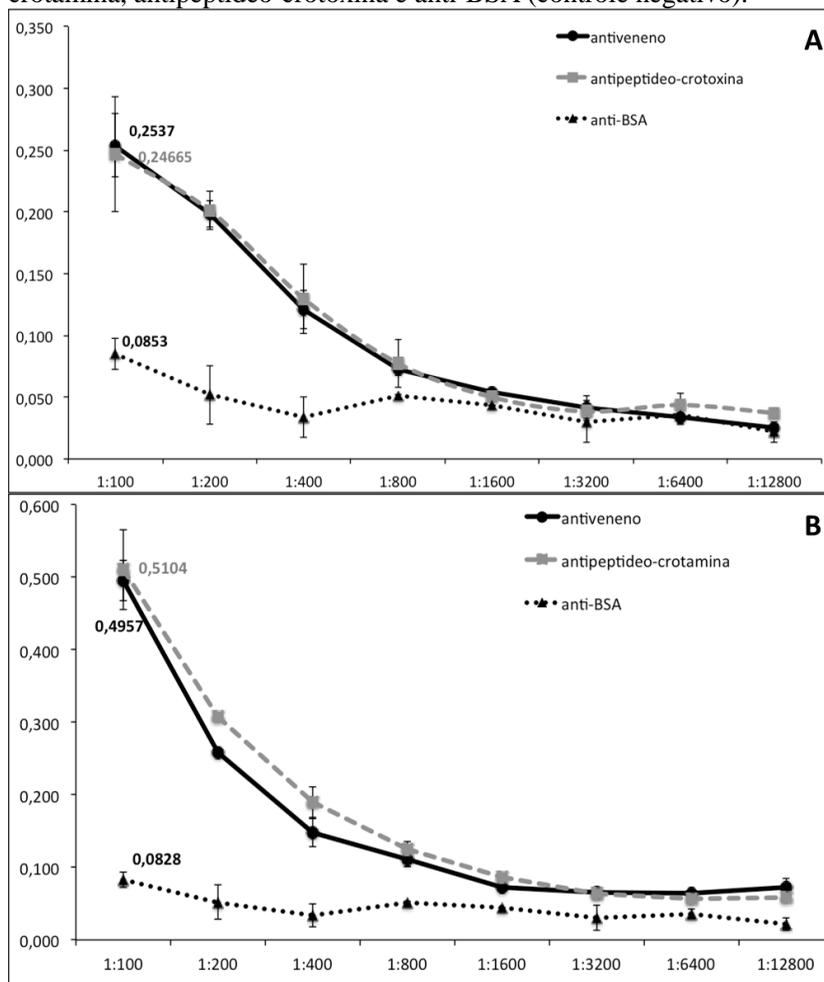
Figura 10 -Reatividade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* contra os soros de camundongos antiveneno (controle positivo), anti-peptídeo-crotamina, anti-peptídeo-crotoxina e anti-BSA (controle negativo). Todos os soros estão diluídos na concentração 1:100 em tampão de incubação.



Fonte: Do Autor

Os resultados da figura 11 apresentam a imunogenicidade de ambos peptídeos através de uma curva de titulação dos peptídeos com seus respectivos soros. A figura 11A mostra que o peptídeo da crotoxina foi reconhecido pelo soro de camundongo anti-peptídeo-crotoxina. Já a figura 11B, mostra o reconhecimento do peptídeo da crotamina pelo soro de camundongo anti-peptídeo-crotamina. Além disso, ambos os peptídeos reconheceram o soro de camundongo antiveneno na mesma potência em que reconheceram os seus respectivos anti-peptídeos. Como esperado os peptídeos não reconheceram o soro de camundongos anti-BSA (controle negativo).

Figura 11 -Reatividade do veneno dos peptídeos sintetizados contra os soros de camundongos antiveneno (controle positivo), anti-peptídeo-crotamina, anti-peptídeo-crotoxina e anti-BSA (controle negativo).



Em **A**, a placa foi sensibilizada com o peptídeo da crotoxina, e este avaliado contra os soros de camundongos antiveneno, anti-peptídeo-crotoxina e anti-BSA. Em **B**, a placa foi sensibilizada com o peptídeo da crotamina, e este avaliado contra os soros de camundongos antiveneno, anti-peptídeo-crotoxina e anti-BSA. Todos os soros foram avaliados em uma diluição seriada, iniciada na concentração de 1:100 em tampão de incubação.

Fonte: Do Autor.

4.5 AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Por fim, após confirmação da antigenicidade dos peptídeos preditos e sintetizados eles foram avaliados quanto a sua capacidade imunogênica a partir do ensaio de neutralização *in vivo*. Para isso, os animais imunizados foram desafiados com a injeção subcutânea do veneno da serpente *C. d. terrificus* na dosagem correspondente a duas DL50 (10 mg/kg). Os resultados são mostrados na tabela 2, indicando que tanto o grupo que teve os animais imunizados com o peptídeo da crotoxina, quanto o grupo que teve os animais imunizados com o peptídeo da crotamina sobreviveram ao envenenamento com o veneno da serpente *C. durissusterrificus*, mesmo em alta dose, apresentando uma taxa de sobrevivência igual a do grupo controle (veneno). Como esperado, os animais que foram imunizados por uma proteína inerte ao veneno (grupo BSA) vieram ao óbito.

Tabela 2 -Resultados da Neutralização *in vivo*.

Grupos imunizados	Número de sobreviventes	% de animais que tiveram o veneno neutralizado
Grupo PBS(controle negativo)	0/4	0 %
Grupo Veneno de <i>Crotalus durissusterrificus</i> (controle positivo)	4/4	100 %
Grupo peptídeo-crotoxina	4/4	100 %
Grupo peptídeo-crotamina	4/4	100 %

Animais imunizados com BSA (grupo controle negativo), veneno de *Crotalus d. terrificus* (controle positivo) e peptídeos crotamina e crotoxina, foram desafiados com a injeção subcutânea do valor correspondente a 2DL50 de veneno (10 mg/kg) e foi contabilizado o número de sobrevivente após 48 horas.

Fonte: Autor

5 DISCUSSÃO

O tratamento recomendado pela Fundação Nacional de Saúde para casos de acidentes ofídicos é o uso do soro heterólogo antiveneno de origem equina. Estes soros terapêuticos são preparados a partir de plasmas de cavalos hiperimunizados, e considerados o único tratamento específico para envenenamento por serpentes no Brasil (MINISTERIO DA SAÚDE, 2016). Estes soros são capazes de impedir a ação de componentes do veneno e, conseqüentemente, os seus efeitos patológicos. Entretanto, este tratamento pode ser arriscado devido a reações de hipersensibilidade que podem ocorrer durante a infusão do antiveneno e nas duas horas subsequentes (FUNASA, 2001; ANVISA, 2017).

Outro problema deste tratamento sorológico está relacionado às questões bioéticas do uso destes cavalos na produção dos soros, pois a imunização destes animais com o veneno bruto exerce todos os efeitos extremamente nocivos desencadeando um complexo de sintomas clínicos devido à perturbação dos sistemas neuromuscular, cardiovascular e respiratório, ocasionando a morte precoce do animal, cuja média de vida é de vinte e cinco anos passa para quatro anos, e reduzindo drasticamente o número de animais úteis para a produção de soros. (Calmette, 1894; Machado-de-Ávila, et al, 2004; Gazarian, et al, 2005; Chippaux, et al, 2007).

Além do problema com efeito tóxico do veneno, devido à complexidade molecular deste, quando utilizado como imunógeno gera apenas de 10 a 20% de resposta imune contra as proteínas tóxicas do veneno. Este fato se deve as proteínas tóxicas corresponderem somente a uma frações do veneno. Assim, outras frações não tóxicas desencadeiam uma resposta imune em conjunto com a fração tóxica do veneno. Assim, os anticorpos produzidos são anticorpos heterólogos, por conseguinte, imunógenos pouco eficazes e podem ser responsáveis pelos efeitos adversos (Demangel et al, 2000). Neste sentido provém a importância deste trabalho na identificação de potenciais epítomos das principais toxinas do veneno, crotamina e crotalina, para serem utilizados como novos antígenos para obtenção de uma resposta imunitária mais eficaz contra as proteínas tóxicas mais importantes do veneno e conseqüentemente contra o veneno, o que é evidenciado nos resultados demonstrados na tabela 2 (Gutierrez, León, Bumouf, 2011).

Nesta mesma linha, vários autores buscam o desenvolvimento de novos antígenos que não sejam tóxicos, para que possa substituir o uso de venenos como imunógeno e sem perder a capacidade de produzir anticorpos neutralizantes contra estes. Estes trabalhos visam encontrar nas toxinas do veneno, a parte responsável por induzir a resposta imunológica, ou seja, o epítipo desta toxina (Machado-de-Ávila, et al, 2004; Felicori, et al, 2005; Ferreira, et al, 2006; Gomes, et al, 2008; Duarte, et al, 2010; Machado-de-Ávila, et al, 2011; Schneider, et al, 2012; Mendes, et al, 2013; Schneider, et al, 2014; Figueiredo, et al, 2014; Machado-de-Ávila, et al, 2014; Duarte et al, 2015; Mendes et al 2015; Ramos et al, 2016). Da mesma forma no presente trabalho, encontrou-se um epítipo conformacional para cada uma das duas toxinas do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, estes epítipos sintetizados na forma de peptídeos foram nomeados por peptídeo-crotamina e peptídeo-crotoxina, provenientes das toxinas crotamina e crotoxina, respectivamente.

A busca da estrutura tridimensional no PDB da crotoxina obteve como resultado a estrutura de código do 3R0L. Esta estrutura foi resolvida por cristalografia por difração de raios-X em 2011 e apresentou uma resolução de 1,35 Å. O seu cristal apresentou quatro subunidades, sendo três subunidades referentes às cadeias ácidas da crotoxina e a quatro subunidades, cadeia D, referente à subunidade básica, responsável pela atividade de fosfolipase A2 da molécula. (Faure, Xu, Saul, 2011). Como a cadeia D, composta de 122 aminoácidos era a responsável pela atividade de PLA2, ela foi utilizada neste trabalho. A escolha desta cadeia ocorreu por ser a única com atividade enzimática. As outras cadeias são carentes de atividade (Fusco, et al, 2015) e quando a crotoxina é dissociada, as atividades miotóxica e neurotóxicas são observadas apenas na subunidade fosfolipásica (Rodriguez et al 2006; Sampaio et al, 2010). Ao observar a estrutura ilustrada na figura 5B, da subunidade fosfolipásica, nota-se que é composta por sete pontes dissulfeto, sua porção N-terminal inicia-se em uma α -hélice e termina com um loop na porção C-terminal.

A crotamina é a outra toxina do veneno estudada neste trabalho, a estrutura selecionada no PDB foi de código 4GV5. Essa estrutura foi determinada em 2013 por cristalografia por difração de raios-X, com uma resolução de 1,70 Å. Esta estrutura está ilustrada na figura 5A é considerada um polipeptídeo de baixo peso molecular constituído por quarenta e dois aminoácidos com suas duas porções (N e C-terminal) formadas por um loop (Coronado et al 2013a).

O principal critério de escolha no PDB foi a resolução das estruturas. Tanto a crotoxina, quanto a crotamina possuem outras estruturas depositadas no PDB. Utilizou-se neste trabalho a que apresentava resolução de menor tamanho. Essa escolha foi baseada na definição apresentada por Rhodes (2006), onde ela afirma que quanto menor o tamanho na resolução de um cristal, melhor é a definição da estrutura 3D cristalografada.

Assim, as duas toxinas são proteínas de baixo peso molecular, formadas por 122 aminoácidos, crotoxina, e 42 aminoácidos, crotamina. Por outro lado, os peptídeos preditos neste trabalho possuem ambos 10 aminoácidos, o peptídeo-crotoxina de sequência WLWHIQYKNL (figura 8) e o peptídeo-crotamina de sequência YCHKKGKCHK (figura 9). Desta forma, é presumível que o pequeno tamanho dos peptídeos, façam com que eles, ao contrário das toxinas que os originam, não apresentem toxicidade. Isso se deve ao fato deles não conseguirem atuar nos substratos e canais iônicos. Todavia, eles são capazes de gerar uma boa resposta imune, como relata por Kozlova et al (2015).

É importante frisar que no *design* de um peptídeo que mimetize um epítipo o ideal é que este possua cerca de 10 a 20 aminoácidos. Isso porque se o peptídeo for muito curto, os anticorpos produzidos a partir deles poderão reconhecer diversas proteínas que possuam sequências de aminoácidos parecidas, perdendo assim a especificidade do anticorpo. Do contrário, se for muito longo, os anticorpos produzidos podem ter dificuldade de reconhecer o local de ligação da região mimetizada, já que o peptídeo começara a adquirir uma estrutura secundária e deixará de ser flexível (Amitet al, 1985; Edward et al, 2000; Francica et al, 2010). O tamanho de 10 a 20 aminoácidos se deve ao fato de alguns estudos que avaliaram a interação antígeno-anticorpo através da cristalografia de raios-X demonstrarem que o sítio de interação entre o epítipo e o paratopo possui esse tamanho (Amitet al, 1985; Amitet al, 1986).

Como a conformação das duas toxinas possui ações enzimáticas, e as enzimas se ligam aos seus substratos de forma conformacional, comprovam que os epítipos destas duas toxinas são conformacionais e não lineares. Este fato subsidiado por Van Regenmortel (1996) que afirma que os epítipos para promover uma reação imune são na maioria das vezes conformacionais. Somado a isso, a predição de epítipos conformacionais através da bioinformática é um método que possivelmente substituirá a atual forma de produção de antiveneno, que apresenta alto custo de produção, problemas relacionados às questões bioéticas, além do baixo rendimento de produto final. Estudos

demonstram que anticorpos que se ligam a epítomos conformacionais possuem maior poder neutralizante sobre a toxicidade do veneno, uma vez que esses anticorpos são mais específicos a neutralizar o efeito tóxico do veneno (Devaux et al, 1997; Alvarenga et al, 2005).

Sabe-se que um epítomo possui algumas características fundamentais para sua funcionalidade. Além do seu tamanho, as qualidades mais importantes são a hidrofiliçidade, acessibilidade e sua flexibilidade (Parker et al 1986; Machado-de-Ávila et al, 2014). Kozlova et al (2015) destaca ainda que os aminoácidos que possuam essas propriedades (como acessibilidade ao solvente, serem hidrofílicos ou mesmo aqueles aminoácidos considerados conservados por estarem sempre presente em epítomos), somente possuem significância na formação do epítomo e não quando utilizados sozinhos. Porém podem adquirir importância quando utilizados em conjunto com outros aminoácidos.

Portanto, neste trabalho, para a predição dos epítomos conformacionais para as duas toxinas, utilizou-se a acessibilidade ao solvente para a seleção dos aminoácidos mais favoráveis à ligação antigênica. Esta escolha se baseou na definição de um epítomo feita por Van Regenmortel (1996), em que um epítomo é a região de um antígeno capaz de se ligar em um paratopo de um anticorpo induzindo uma resposta imune. Assim, como o epítomo tem que se ligar ao paratopo dos anticorpos, conseqüentemente ele tem que estar acessível na proteína. Desta forma, os aminoácidos selecionados pelo programa *STING Millennium* e mostrados em vermelho na figura 8 para crotocina e na figura 9 para crotamina são os mais acessíveis nas toxinas e com alto potencial epítomos. Metodologia parecida foi utilizada por Machado-de-Ávila, et al (2014) que encontrou um epítomo conformacional para a Mutalissina II, uma metaloproteinase do veneno da serpente *Lachesis muta muta* (surucucu) a partir dos aminoácidos acessíveis ao solvente. Neste trabalho, eles viram que o epítomo conformacional desenhado foi capaz de neutralizar o efeito hemorrágico do veneno.

O desenho do peptídeo ilustrado na figura 8 para a crotocina e figura 9 para crotamina foi realizado a partir da definição da região das toxinas que mais apresentavam aminoácidos selecionados no programa *STING Millennium*. O tamanho desta região não poderia passar de 20 Å de diâmetro. O tamanho máximo deve-se ao fato de ser o tamanho médio do diâmetro de um paratopo (Duquesnoy, 2006; Machado-de-Ávila, 2011; Assis, 2013; Machado-de-Ávila, et al 2014). Assim o epítomo predito não apresentou um diâmetro superior a 20 Å entre sua porção C e N-Terminal.

Assim o peptídeo foi desenhado ligando-se os aminoácidos selecionados dentro desta região de diâmetro até 20 Å. Os aminoácidos foram ligados de acordo com a distância espacial entre eles, ou seja, um aminoácido selecionado ligou-se no aminoácido vizinho mais próximo. Quando entre dois aminoácidos selecionados, existia espacialmente um aminoácido não selecionado, este aminoácido era utilizado como ligante, a fim de respeitar a estrutura conformacional da região (figura 8 e figura 9, cor verde).

Esta metodologia de desenho do peptídeo também foi baseada no trabalho de Machado-de-Ávila et al(2014) que também utilizou uma região de desenho com diâmetro de 20 Å, e propuseram um peptídeo ligando os aminoácidos mais acessíveis com os aminoácidos vizinhos espaciais. Neste trabalho, os autores afirmam que os aminoácidos utilizados como ligantes, mesmo não estando acessíveis na proteína, ou seja, mesmo não selecionados no *STING*, são importantes para o desenho do peptídeo já que exercem um papel importante de manter no peptídeo as mesmas propriedades físico-químicas e conformacionais da região epitópica da proteína. Da mesma forma no presente trabalho, o peptídeo-crotocina de sequência WLWHIQYKNL e o peptídeo-crotamina de sequência YCHKKGKCHK possuem as mesmas propriedades físico-químicas e conformacionais da região epitópica de suas respectivas proteínas.

O peptídeo predito e sintetizado para crotocina foi formado pelos aminoácidos Trp-30, Leu-2, Trp-61, His-1, Ile-63, Gln-4, Tyr-66, Lys-7, Asn-6, Leu-3, estes aminoácidos estão bem distribuídos na estrutura primária da proteína, sendo encontrados na região N-terminal (His-1, Leu-2, Leu-3, Gln-4, Asn-6 e Lys-7) e na região central (Trp-30, Trp-61, Ile-63 e Tyr-66), no entanto estão todos próximos espacialmente, encontrados em uma mesma região na proteína em sua estrutura tridimensional.

Faure, Xu, Saul (2011) mostraram que os aminoácidos His-1, Leu-2, Leu-3, Lys-7, Trp-30 e Trp-61 são importantes na proteína por darem estabilidade a estrutura, ou seja, são importantes para manter a crotocina numa conformação estrutural adequada para interação com seu ligante, no substratos e canais iônicos, exercendo a assim sua ação tóxica. Neste contexto, a partir de análise *in silico* realizada neste trabalho para predição do epítipo conformacional desta proteína, pode-se extrapolar que esse peptídeo, quando utilizado como imunógeno, irá gerar anticorpos capazes de reconhecer e se ligarem a estes aminoácidos, e ao

se ligarem, os anticorpos irão modificar a estrutura da tridimensional de crotoxina fazendo com que esta perca a atividade tóxica.

Da mesma forma, o peptídeo proposto como epítipo para a crotamina formado pelos aminoácidos Tyr-1, Cys-11, His-10, Lys-39, Lys-38, Gly-8, Lys-7, Lys-6, His-5, Lys-2, localizados na região N-terminal (Tyr-1, Lys-2, His-5, Lys-6, Lys-7, Gly-8, His-10 e Cys-11) e na região C-terminal (Lys-38 e Lys-39) apesar de espalhados na estrutura primária da proteína, apresentam-se próximo na proteína enovelada, indicando assim seu caráter conformacional. Interessantemente, os aminoácidos Tyr-1 e Lys-2 foram demonstrados como sendo importantes para ligação da crotamina com os canais para K^+ voltagem dependentes. A Cys-11 na crotamina faz ligação de dissulfeto com a Cys-30, sendo então responsável por dar a estabilidade estrutural a crotamina. Já os aminoácidos Lys-2, Lys-6, Lys-7, Lys-38 e Lys-39, junto com outros seis aminoácidos são responsáveis pelo potencial catiônico da superfície da crotamina. Este potencial catiônico é responsável pela ligação com os fosfolípidos e outras moléculas carregadas negativamente (Coronado et al, 2013b).

Assim o peptídeo-crotamina sintetizado neste trabalho e mimetizante desta região, ao ser utilizado como imunógeno para gerar anticorpos contra esses aminoácidos, faz com que esses anticorpos, ao se ligarem à crotamina, desestabilizem-na estruturalmente impedindo que a Cys-11 faça ligação de dissulfeto. E ao se ligarem aos aminoácidos de Lys-2, Lys-6, Lys-7, Lys-38 e Lys-39, bloqueia esses aminoácidos e assim a superfície da crotamina perde o seu potencial catiônico, diminuindo a interação com as fosfolipase e bloqueando o efeito tóxico. Ainda, a ligação dos anticorpos anti-peptídeo-crotamina aos aminoácidos Tyr-1 e Lys-2 da crotamina faz com que essa toxina perca a sua capacidade de interagir com os canais para K^+ , não o desestabilizando e assim também bloqueando o efeito tóxico da toxina.

Depois das análises *in silico* indicarem que os peptídeos desenhados eram epítipos conformacionais para a crotoxina e crotamina, seguiu-se para as análises *in vivo* e *in vitro* para validar os resultados *in silico*, isto é, verificar se os peptídeos realmente exerciam, *in vivo*, a função de um epítipo conformacional. Para isso os peptídeos foram sintetizados quimicamente através da técnica Fmoc-sínteses, obtendo-se os peptídeos solúveis: WLWHIQYKLN, nomeado de peptídeo-crotoxina e YCHKKGKKHK e nomeado peptídeo-crotamina.

Após a síntese, camundogos da linhagem *Swiss* (20 ± 2) g foram imunizados para obtenção dos anticorpos anti-peptídeo. Como controle

positivo, utilizou-se o veneno de *C. durissus terrificus* para obtenção de anticorpos antiveneno e, como controle negativo, utilizou-se uma proteína inerte, o BSA, para obtenção de anticorpos anti-BSA. As imunizações foram adaptadas para camundongos, mas continuaram a seguir a metodologia preconizada pelo Ministério da Saúde para obtenção do soro anticrotálico comercial. Em estudos realizados por Mendes (2012) e Assis (2013), nos quais utilizou-se peptídeos imunogênicos, foi visto que o modelo murino é capaz de substituir o modelo com animais de grande porte, apresentando excelentes respostas imunológicas, mesmo utilizando uma quantidade muito menor de peptídeo e/ou veneno.

A definição das doses de antígenos utilizadas em cada grupo baseou-se no estudo de Machado-de-Ávila et al (2011). O grupo controle positivo que teve como antígeno o veneno de *Crotalus durissus*, recebeu 1,25 mg/kg de veneno por camundongo. Esta dose correspondente ao valor de $\frac{1}{4}$ da DL-50 e foi definida por ser uma dose capaz de induzir resposta imunológica sem matar o animal imunizado. Como controle negativo, utilizou-se o BSA como antígeno. Como o BSA não é uma proteína presente no veneno da serpente, os anticorpos produzidos por este não serão capazes de neutralizar o veneno e funcionam perfeitamente como controle negativo. Vale ressaltar, que Machado-de-Ávila et al (2004), verificaram a capacidade neutralizante de uma fração do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* associada ao BSA em camundongos Balb/C e Black-C57 e utilizando o BSA na mesma dose deste trabalho como controle negativo e mostrou que o BSA sozinho não gerava anticorpos neutralizantes para o veneno do escorpião.

Nos grupos que receberam como antígeno os peptídeos, as doses foram de 2,5 mg/kg de peptídeo. A diferença dos valores imunizados entre os grupos peptídeos e os grupos controles deve-se à massa e ao tamanho das moléculas. Os peptídeos são moléculas pequenas de apenas 10 aminoácidos, já o veneno possui diversas proteínas, algumas com mais de 100 aminoácidos como é o caso da crotóxina. Lembrando que quanto maior a proteína maior é sua propriedade imunogênica. (Machado-de-Ávila et al, 2004, Kozlova et al 2015). Desta forma, a dosagem maior de utilizada para os peptídeos nas imunizações foi no intuito de tentar minimizar a competição imunogênica desleal com proteínas. Além disso, essa mesma dosagem já vem sendo utilizadas em outros trabalhos que também utilizam peptídeos como imunógenos para produção de anticorpos policlonais (Ferreira et al, 2006; Machado-de-

Ávila et al, 2011; Machado-de-Ávila et al, 2014; Castro et al, 2015; Toledo-Machado et al, 2015).

Após as imunizações, os animais tiveram seu sangue coletado e obteve-se após etapas de centrifugação o soro desses animais. Um peptídeo para ser considerado um epítipo conformacional deve apresentar resposta antigênica e imunogênica (Van-Regenmortel, 1996). A resposta antigênica é definida como aquela capaz de ligar aos anticorpos, já a resposta imunogênica é aquela capaz de gerar uma resposta imunológica a partir dessa ligação (Abbas, Lichtman, Pillai, 2015). Assim, para confirmar se os peptídeos são capazes de interagir com os anticorpos, ou seja, avaliar sua capacidade antigênica dos peptídeos, realizou-se o ensaio de ELISA indireto.

O teste de ELISA apresenta sucesso em diversos estudos envolvendo a produção de antivenenos. Duarte (2007) confirmou a produção de anticorpos contra toxinas escorpônicas através deste método. Da mesma forma, como já dito, Machado-de-Ávila et al, 2004 verificaram a capacidade antigênica de uma fração tóxica do veneno *Tityus serrulatus* associada ao BSA, utilizando a mesma metodologia.

Os resultados dos ensaios de ELISA apresentados na figura 11 mostraram que ambos os peptídeos foram capazes de ligar aos anticorpos gerados, comprovando, assim, sua capacidade antigênica. Esses resultados mostraram também que os peptídeos também foram capazes de reconhecer o soro anticrotálico, ou seja, que os soros anticrotálicos são capazes de se ligar a cada um dos peptídeos. Já os resultados apresentados na figura 10, mostraram que ambos os anti-peptídeos reconheceram o veneno da serpente de *Crotalus durissus terrificus*. A diferença entre os valores de absorvância encontrados (1,2840 para o antiveneno, 0,3463 para o anti-peptídeo-crotamina e 0,2342 anti-peptídeo-crotoxina) provavelmente está relacionada à composição do veneno. É importante enfatizar que o veneno do *C. durissus terrificus* é uma mistura complexa de várias proteínas, peptídeos, carboidratos e outros componentes, e assim, todas essas moléculas funcionam no organismo do animal imunizado como antígenos, gerando anticorpos contra todos eles. Desta forma, o anticorpo antiveneno é uma mistura de anticorpos policlonais contra todas essas moléculas (Vital Brazilet al, 1979; Chávez-Olortegui, et al, 1997). Muito dessas moléculas não possuem efeito tóxico o que de certa forma, faz com que os anticorpos realmente importantes para neutralizar o veneno estejam em menor concentração no soro (Chávez-Olortegui, et al, 1997). Assim a diferença de valores encontrados deve-se aos

anticorpos inespecíficos presentes no soro antiveneno que também reconhecem as moléculas não tóxicas do veneno, provavelmente geraram apenas os 10 a 20% de resposta imune contra as proteínas tóxicas do veneno (Demangel et al, 2000). Já os anticorpos anti-peptídeo-crotamina e anti-peptídeos-crotoxina, como foram produzidos a partir de apenas um peptídeo reconheceram provavelmente apenas as toxinas de onde eles se originaram, crotamina e crotoxina respectivamente.

Então, validar os peptídeos como antigênicos, seguiu-se para verificar se os peptídeos também eram imunogênicos. Ou seja, após mostrar pelo teste de ELISA que o peptídeo desenhado por bioinformática a partir de uma previsão *in silico* de um epítipo conformacional era capaz de se ligar e gerar anticorpos, o próximo passo foi verificar se esses anticorpos gerados seriam capazes de provocar uma resposta imunológica, no caso, neutralizar a ação do veneno. Para isso, os camundongos que foram imunizados receberam uma injeção de *Crotalus durissus terificus* na dose 10 mg/kg, valor correspondente a duas DL-50 do veneno, ou seja, capaz de matar todos os animais. A tabela 2 mostra que todos os animais que foram imunizados com veneno de *Crotalus durissus terificus* sobreviveram ao envenenamento, enquanto que os animais que receberam BSA durante as imunizações foram ao óbito. Estes dados estão de acordo com o esperado. Como os animais que receberam o veneno durante as imunizações estavam com alta quantidade de anticorpos antiveneno circulantes, esses anticorpos neutralizaram o veneno, impedindo assim, que levassem os animais ao óbito. Já os animais que receberam BSA durante as imunizações, estavam apenas com anticorpos anti-BSA circulantes que não são capazes de neutralizar a ação do veneno. Por sua vez os peptídeos desenhados, sintetizados e utilizados como imunógenos neste trabalho também foram capazes de neutralizar o efeito letal do veneno em 100% dos animais imunizados com eles, comportando-se da mesma forma que o soro antiveneno se comportou.

A escolha dos antígenos é um fator primordial para a produção da neutralização das principais toxinas responsáveis pelo envenenamento (Butantan, 2013). Assim, os peptídeo-crotamina e peptídeo-crotoxina que apresentaram ser um epítipo conformacional das toxinas crotamina e crotoxina, surgem como ótimas e promissoras moléculas para substituir individualmente ou em conjunto o veneno nas hiperimunizações de cavalos para a produção do soro anticrotálico. A estratégia de imunização de animais através da síntese de peptídeos

sintéticos representativos das principais toxinas pode ser mais um avanço na busca destes produtos ativos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo asseguram que o peptídeo-crotoxina WLWHINYKNL e o peptídeo-crotamina YCHKKGKCHK preditos e desenhados por bioinformática são epítomos conformacionais para as toxinas crotamina e crotoxina respectivamente e que estes peptídeos, quando sintetizados e utilizados como imunógenos, foram capazes de gerarem anticorpos capazes de neutralizar o efeito letal do veneno *Crotalus durissus terrificus*, tornando-se ótimos candidatos para serem utilizados nas hiperimunizações de cavalos para produção de um soro anticrotálico sem provocar dano ao animal imunizado, e produzindo soros mais específicos às porções tóxicas do veneno.

REFERÊNCIAS

- Alvarenga LM, Machado-de-Ávila RA, Amim PR, Martins MS, Kalapothakis E, De Lima ME, Santos RG, Granier C, Chávez-Olórtegui C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 2005; 46(6):664-71.
- Amaral CFS, Rezende NA, Silva OA, Ribeiro MMF, Magalhães RA, Reis RJ, Carneiro G, Castro JRS. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. *Rev. do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1986; 4(28); 220-227
- Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 6 Å resolution. *Nature*. 1985; 313(5998):156-8.
- Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. Three dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science*. 1986. 233(4765):747-53.
- ANVISA. Bula do Soro anticrotálico Imunoglobulina heteróloga contra veneno de *Crotalus durissus* ssp: 1,5 mg/mL. Instituto Butantan São Paulo.
- Assis LM. Predição de epitopos de célula B em proteínas de *Leishmania infantum*: uma análise in silico. Tese (Doutorado em Medicina e Saúde), Universidade Federal da Bahia, 2013.
- Barros GA, Pereira AV, Barros LC, Jr AL, Calvi SA, Santos LD, Barraviera B, Ferreira RS Jr. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania* (L.) *infantum* Chagasi. *Journal of venomous animals and toxins including tropical disease*. 2015; (21) 48.
- Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *British Medical Journal*. 2002. v. 324, n. 7344, p. 1018-1022.
- Bon, C. Snake venom & pharmacopeia. Bauchot, R. (Ed.). *Snakes: a*

natural history. Sterling Publishing Company, Inc., New York, p.194-203.

Borro LC, Stanley RM, Michel EBY, Adaulto LM, José GJ, Edgard HS, Roberto HH, Paula RK, Goran N. Predicting enzyme class from protein structure using Bayesian classification. *Genetics and Molecular Research*. 2006. v.5, n.1, p.193-202.

Brasil. Ministério da Saúde, 2015. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2 ed. Brasília. 2011

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8.ed. Brasília. 2010.

Carvalho D. Efeitos comportamentais do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do soro antiofídico em ratos Wistar. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 2010

Castro, FOF. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico humano. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás. 2011.

Castro KL, Duarte CG, Ramos HR, Machado-de-Ávila RA, Schneider FS, Oliveira D, Freitas CF, Kalapothakis E, Ho PL, Chávez-Olortegui C. Identification and characterization of B-cell epitopes of 3FTx and PLA(2) toxins from *Micrurus corallinus* snake venom. *Toxicon*. 2015;(93);51-60.

Catarino, JQ. Acidente ofídico com serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*. Trabalho de Conclusão de Curso. Licenciatura em Ciências Biológicas. - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Chávez-Olortegui C, Penaforte CL, Silva RR, Ferreira AP, Rezende NA, Amaral CF, Diniz CR. An enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian Bothrops species and Crotalus durissus. *Toxicon*. 1997;35(2);253-60.

Cominetti, MR, Cristina HBT, Oscar HPR, Jay WF, Andrea MO, Marta SF, Camila C. F, Veronica M, Heloisa SSA. Alternagin C, a desintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. v. 279, p. 18247-18255.

Coronado MA, Gabdulkhakov A, Georgieva D, Sankaran B, Murakami MT, Arni RK, Betzel C. Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr.*2013a;(69); 1958-1964.

Coronado MA., Gabdulkhakov A, Georgieva D, Sankaran B, Murakami MT, Arni RK, Betzel C. X-ray structure of crotamine, a cell-penetrating peptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*2013b; (69); 1958-1964.

Corrêa MC, Maria DA, Moura Da Silva AM, Pizzocaro KF, Ruiz IR. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon*. 2002. v.40 p. 739–748.

Cunha EM, Martins OA.

Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras do Gênero *Bothrops* e *Crotalus*: Uma revisão. *Revista Eletrônica de Educação e Ciências* 2012;2(2) ;21-26.

De-Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discovery Today*. 2006. v. 11, n.5-6, p. 203-209.

De Luca M, Ward CM, Ohmori K, Andrews RK, Berndt MC. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, $\alpha_2\beta_1$. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*.1995. v. 206, n. 2, p. 570–576.

Devaux C, Clot Faybesse O, Juin M, Mabrouk K, Sabatier JM, Rochat H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Lett.*1997. 412(4);456-60.

Duarte, CG. Imunoquímica de toxinas escorpiônicas que afetam canais para sódio: mapeamento de epitopos descontínuos. Tese (Doutorado Bioquímica e Imunologia), Universidade Federal de Minas. Gerais Belo Horizonte, 2011

Edwards AM, Arrowsmith CH, Christendat D, Dharamsi A, Friensen JD, Greenblatt JF, Vedadi M. Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. *Nat. Struct. Biol.* 2000; (7);970-972.

Emonard H, Grimaud JA. Matrix met alloproteinases. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 1990 v. 36, p. 131-153.

Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal Structure of Crotoxin Reveals Key Residues Involved in the Stability and Toxicity of This Potent Heterodimeric Beta-Neurotoxin. *J.Mol.Biol.* 2011.(412); 176-191.

Ferreira RN, Machado-de-Ávila, RA, Sanchez EF, Maria WS, Molina F, Granier C, Chávez-Olórtegui C. Antibodies against synthetic epitopes inhibit the enzymatic activity of mutalysin II, a met alloproteinase from bushmaster snake venom. *Toxicon.* 2006; 48(8);1098-103.

Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom met alloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of met alloproteinases. 2005. *Toxicon*, v.45, p. 969-985.

Francica JR, Varela Rohena A, Medvec A, Plesa G, Riley JL, Bates P. Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. *PLoS Pathog.* 2010; 6(9);100-1098.

FUNASA. Manual de diagnostico e tratamento de acidentesoranimaispeçonhentos. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA); 2 ; Brasília; 2001

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

Gomes PC, Machado-de-Ávila, RA, Selenia Maria W, Richardson M, Fortes Dias CL, Chávez Olórtégui C. The co-purification of a lectin (BJcuL) with phospholipases A2 from Bothrops jararacussu snake venom by immunoaffinity chromatography with antibodies to crotoxin. *Toxicon*. 2007; 49(8); 1099-108.

Gueux N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997. v.18, n.15, p.2714-2723.

Guidolin FR, Tambourgi DV, Guidolin R, Marcelino JR, Okamoto CK, Magnoli FC, Queiroz GP, Dias da Silva W. Characterization of anti-crotalic antibodies. *Toxicon*. 2013; (66);7-17.

Higar H, Togawa RC, Montagner AJ, Palandrani JC, Okimoto IK, Kuser P R, Yamagishi ME, Mancini AL, Neshich G. STING Millennium Suite: integrated software for extensive analyses of 3d structures of proteins and their complexes. *BMC Bioinformatics*. 2004. v.5. 5:107.

Huang J, Honda W. CED: A conformational epitope data base. *BioMed Central Immunology*. 2006. v. 7, n.7, p.7.

Klein A, Capitano JS, Maria DA, Ruiz IR. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. *Toxicon*. 2011. v. 57, p. 1-8.

Kolaskar AS, Tongaokar PC. A semi empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS*. 1990; (276); 172-174.

Kopp J, Schwede T. Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics*. 2004. v.5, n.4, p. 405-416.

Kozlova E, Viart B, Machado-de-Ávila, RA, Felicori L, Chavez-Olortégui C. Classification of epitopes in groups based on their protein family. *BMC Bioinformatics*. 2015; 16(19).

Lago LA, Marques Junior PR, Melo M, Lago EP, Oliveira N, Alzamora F. Perfil bioquímico sorológico de bovinos inoculados experimentalmente com veneno crotalítico iodado livre e iodado em

lipossomas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2004; 5(56) ;653-657.

Laing, GD, Moura da Silva AM. Jararhagin and multiple effects on hemostasis. *Toxicon*, 2005. vol.45.n.8,p.987-996.

LeskAM. Introdução à Bioinformática. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2008.

Machado-de-Ávila, RA. Predição de epítomos descontínuos ou conformacionais em proteínas através da bioinformática estrutural. 2011. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Bioinformática. Belo Horizonte; Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Machado-de-Ávila, RA. Predição de epítomos conformacionais aplicada a biotecnologia peptídica no desenvolvimento de Imunobiológicos. 2014. Edital Universal – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS. Criciúma. Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2014.

MAGALHÃES T, VIOTTI A.P, GOMES R.T, DE FREITAS T.V. Effect of membranecomposition and of co-encapsulation of immunostimulants in a liposome-entrapped crotoxin. Biootechnol App. Biochem. 2001.(33); 61-4.

Maggio ET, Ramnarayan K. Recent developments in computational proteomics. *Trends in Biotechnology*. 2001.v.19, n.7, p. 266-272.

Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000. v. 1477, p. 146-156.

Mendes T M. Antígenos para a produção de soro contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

Merrifield RB. Automated synthesis of peptides. *Science*. 1969.v.150, n.3693, p.178-185.

Molina DM. Mapeamento de epítomos da crotoxina, principal neurotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel sul americana). Programa de pos-graduação em Bioquímica e Imunologia. Minas Gerais. 2017

Monika AC, Azat G, Christian B. Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Crystallography D Biol.* 2006; (69);1958-1964.

Moura da Silva AM, Marcinkiewicz M, Niewiarowski S. Selective Recognition of $\alpha_2\beta_1$ Integrin by Jararhagin, a Metalloproteinase/Desintegrin from Bothrops jararaca. *Venom. Thrombosis Research.* 2001. v.102, n.2, p.153-159.

Moura da Silva AM, Ramos OHP, Baldo C, Nilan S, Hansen U, Ventura JS, Furlan S, Butera D, Della Casa MS, Tanjoni I, Clissa PB, Fernandes I, Tavassi AM. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie.* 2008. v. 90, p. 484-492.

Muro LLF, Ferreira LL, Gonzaga PAL. Relação antígeno anticorpo. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária.* 2009. v. 7, n. 12, p. 1-4.

Murphy K. *Imunobiologia de Janeway.* 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Neshich G, Rocchia W, Mancini AL, Yamagishi ME, Kuser PR, Fileto R, Baudet C, Pinto IP, Montagner AJ, Palandrani JF, Krauchenco JN, Torres RC, Souza S, Togawa RC, Higa RH. JavaProtein Dossier: a novel web-based data visualization tool for comprehensive analysis of protein structure. *2004. Nucleic Acids. Research.* v.32. p. 595-601.

Neshich G, Togawa RC, Mancini AL, Kuser PR, Yamagishi ME, Pappas GJR, Torres WV, Fonseca T, Ferreira LL, Luna FM, Oliveira AG, Miura RT, Inoue MK, Horita LG, De Souza DF. STING Millennium: a web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Research.* 2003.13(31); 3386-3392.

Oliveira KC. Aspectosestruturais de proteínas do venenocrotálicomodificadasporradiaçãoionizante. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e NuclearesUniversidadeAutarquia Associada. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.

Paine N,Desmond HP, Theakston RD, Crampton JM.Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic met alloproteinase, jararhagin from BothropsJararaca venom.The Journal of Biological Chemistry.1992(267); 22869-22879.

Pardal PPO, Da Silva CLQ, Hoshino SSN, Pinheiro MFR.Snake bite by therattle snake (crotalus SP.) in Ponta de Pedra – A Case repor. Revista Paraense de Medicina.2007;3(21) ;69-73.

ParhamP.O sistema Imune. 3.ed. Porto Alegre: Aetmed, 2011.

Pellequer JL, Westhof E. Preditop: a program for antigenicity prediction. Journal of Molecular Graphics.1993. 3(11); 202-210.

Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo, Rev. Assoc. Med. Bras.2001; 1(47); 24-29.

Ribeiro GB. Almeida HC, Velarde DT, Sá ML.Study of crotoxin on the induction of paralysis in extraocular muscle in animal model. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 2012; 5(75);307-312.

Rodriguez JP, De Marzi M, Marunak S, Malchiodi EL, Leiva LC, Acosta
O.Rabbit IgG antibodies against phospholipase A2 from Crotalus duriss us terrificus neutralize the lethal activity of the venom.Med.2006. (66); 512-516.

Sampaio SC,Hyslop S, Fontes MR, Prado Franceschi J, Zambelli VO,Magro AJ. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxic. Toxicon. 2010; (55); 1045-1060.

Santos AM. Técnicas de Bionformática aplicadas ao estudo de Poligalacturonases de fungos. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2012.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. 2003. v.31, n. 13, p.3381-3385.

Seals DF, Courtneidge SA. The ADAM's family of met alloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes e Desenvolvimento*. 2003. v. 17, p. 7-30, 2003.

Tanjon K, Tanjoni I, Evangelista K, Della Casa M, Butera D, Magalhaes G, Baldo C, Clissa P, Fernandes I, Eble J, Moura Silva A. Different regions of the class P-III snake venom met alloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin and collagen. *Toxicon*. 2010 v.55, p.1093–1099.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994. v.22, n. 22. P. 4673-46-80.

Ticli FK. Caracterização Funcional e Estrutural de uma L-Aminoácido Oxidase do veneno de *Bothrops Jararacussu* e Avaliação de sua ação Antitumoral, Antiparasitária E Bactericida. 2006. Tese (Doutorado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

Tokarnia CH, Peixoto PV. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2006. v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.

Toledo Machado CM, Bueno LL, Menezes Souza D, Machado-de-Ávila RA, Nguyen C, Granier C, Bartholomeu D.C, Chávez-Olórtegui C, Fujiwara RT. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. *Parasit Vectors*. 2015;(28)8-133.

Van-Regenmortel MHV. Mapping epitope structure and activity: from one- dimensional prediction for four-dimensional description of antigenic specificity. *Methods*. 1996.(9); 465-472

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

Ventura JSVH. Il-1 e TNF- medeiam a ação trófica da ouabaína nas células ganglionares da retina. 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro. 2011.

White J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. 2005;(45); 951-967.

ANEXO(S)

ANEXO A – Certificado da CEUA/UNESC.



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Predição de epítomos conformacionais da Crotoxina e Crotamina, as duas principais proteínas tóxicas da serpente *Crotalus durissus terrificus*.**", registrada com o protocolo nº **080/2016-1**, sob a responsabilidade de **Ricardo Andrez Machado de Ávila**, junto à equipe: **Juliana Pasini de Souza, Kariny Raimundo Silveira, Victor Garcia Freire** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **26/07/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2016 a 30/07/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Swiss
Nº de animais	32
Peso/Idade	Não especificado
Sexo	Feminino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Prediction conformational epitopes of the Crotoxine and Crotamine, the two principals toxic proteins *Crotalus durissus terrificus* snake**".

Protocol number: **080/2016-1**

Principal Investigator: **Ricardo Andrez Machado de Ávila**

Researchers: **Juliana Pasini de Souza, Kariny Raimundo Silveira, Victor Garcia Freire.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 26 de julho de 2016.


 Jairo José Zocche
 Coordenador da CEUA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

Criciúma
2017