

Universidade do Estado do Amazonas
Escola Superior de Ciências da Saúde do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais

**EFEITOS DA AUTOPROTEÓLISE E DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS
NAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANTIGENICIDADE DAS TOXINAS
DO VENENO DA SERPENTE AMAZÔNICA *Bothrops atrox*
(Linnaeus, 1758) “JARARACA”.**

REBECCA TAVARES E SILVA

MANAUS

2009

Universidade do Estado do Amazonas
Escola Superior de Ciências da Saúde do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais

REBECCA TAVARES E SILVA

**EFEITOS DA AUTOPROTEÓLISE E DE FATORES FÍSICO-QUÍMICOS
NAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANTIGENICIDADE DAS TOXINAS
DO VENENO DA SERPENTE AMAZÔNICA *Bothrops atrox*
(Linnaeus, 1758) “JARARACA”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, área de concentração Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis López-Lozano

MANAUS

2009

Aos meus pais, Jonas e Deuzimar, irmãos Samantha, Steven e Nicholas, cunhado Sirley, amiga Fabiane e ao meu Orientador Lozano pelo apoio, companhia, carinho, amizade e ensinamentos. À vocês dedico esta Dissertação.

Por vocês eu consegui!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Luis López Lozano, por ter me aceito como orientanda, ter acreditado que eu era capaz e por ter sido um grande amigo durante todo esse tempo.

Aos meus pais e irmãos por terem acreditado em mim e me apoiado incondicionalmente sempre.

Aos meus parentes, principalmente a Vovó Luzia, Tio Paulo, Tio Osvaldo, Tia Cideni, Úrsula Souza, Aline Souza, Fábio Henrique, Marcela Maria, Paula Patrícia, Amanda Karime e Núbia Leila, pelo acolhimento, paciência, custeio e hospedagem em Manaus.

Aos amigos André Higa, Fabiana Rocha, Maria das Dores Noronha, André Silva, Bruno Medeiros, Mirian dos Santos, Elzafã Souza e João Paulo Catunda, companheiros de todas as horas, pelos grandes ensinamentos, auxílio e companhia nas práticas cotidianas de laboratório.

Aos grandes amigos que fiz em Manaus: Fabiane Silva, André Felipe, Graciela Nascimento, Natasha Farias, Érika Martellet, Roberto Bianco, Raimundo Menezes, Karla Nunes, Ana Fabíola, Renata Arueira, Denise Benzaquem, Stephanie Quinonez, Maria Dolores, Jucileuza Conceição, Maria José, Débora Rabello, Jorge Porto, Audrey D'Assunção e Jaqueline Inês pelo apoio, companheirismo e amizade.

Ao Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Professor Paulo Friedrich Buhrnheim”, pela plataforma proteômica disponível para a execução desse trabalho.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade e à FAPEAM, CNPq e FINEP, pelo auxílio financeiro.

“... Veni, vidi, vici...”

Júlio César

RESUMO

Na Amazônia Brasileira a serpente peçonhenta *Bothrops atrox* (Viperidae) é responsável por 90% dos acidentes ofídicos. Seu veneno possui atividades anticoagulante, proteolítica e hemorrágica (local e sistêmica). A proteólise e fatores físico-químicos (mudanças de pH, temperatura, composição do solvente) e o tempo de ação do agente, podem afetar a estrutura tridimensional/estado conformacional nativo de uma proteína, o que poderia levar ao surgimento de proteínas e peptídeos com atividades biológicas e antigenicidade diferentes da proteína de origem. Na literatura revisada não foram encontradas informações a cerca destas influências sobre as atividades biológicas e antigenicidade das toxinas do veneno de *B. atrox*. Devido a isso, o presente trabalho prestou a avaliar as atividades biológicas e a antigenicidade das toxinas do veneno após autoproteólise a 37°C por até uma semana, em diferentes soluções tampão (PBS - 100 mM, pH 7,2 e COLAGENASE - Tris 50 mM, pH 7,5). Os resultados demonstraram que os perfis moleculares, as atividades biológicas e a antigenicidade das toxinas do veneno de *B. atrox* autoproteolisado segundo o tempo de incubação foram intensamente influenciados pelos constituintes das soluções tampão utilizadas no processo experimental. Brij 35, constituinte do tampão COLAGENASE, protegeu principalmente da degradação proteolítica e congelamento-descongelamento, as metaloproteinases da classe P-I (23 kDa) e P-III (50 kDa) do veneno, preservando a estrutura/função biológica delas, influenciando dessa forma na elevada atividade hemorrágica, toxicidade e letalidade do veneno. O veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão PBS obteve decréscimo quantitativo do total de toxinas conforme verificado no perfil molecular, e a rápida degradação das metaloproteinases hemorrágicas da classe P-III, durante o tempo de incubação a 37°C, causa grande decréscimo das atividades hemorrágica, proteolítica, edematogênica e letal. O soro hiperimune experimental obtido usando-se como antígeno a amostra do veneno de *B. atrox* autoproteolisado por uma semana a 37°C em tampão PBS apresenta satisfatória eficácia neutralizante das atividades hemorrágica, proteolítica e letal contra o veneno *in natura* de *B. atrox*, e também baixa toxicidade no processo de imunização de animais de laboratório. Os resultados sugerem a purificação de peptídeos/proteínas atóxicas do veneno de *B. atrox* proteolisado a 37°C por suas próprias proteases por uma semana em tampão PBS (100 mM), pH 7,2 avaliando sua atividade antigênica gerando subsídios para produção de vacina/soro antibotrópico específico contra o veneno da serpente amazônica *B. atrox*.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*, autoproteólise, fatores físico-químicos, toxicidade, soro hiperimune experimental, vacina antibotrópica.

ABSTRACT

In Brazilian Amazonian rain forest venomous snake *Bothrops atrox* (Viperidae) are responsible for 90% of snakebites. Its venom has anticoagulant, proteolytic and hemorrhagic (local and systemic) biological activities. Proteolysis and physicochemical factors (pH changes, temperature, composition of solvent) and the time of the agent's action can affect the three-dimensional structure/conformational state of a native protein, which could lead to the emergence of proteins and peptides with different biological activities and antigenic properties when comparational with original protein. Literature review found no information about these influences on the biological activities and antigenicity of toxins from venom of *B. atrox* venom. Because of this, this work provided to evaluate the biological activities and antigenicity of toxins from the venom after autoproteolysis at 37 °C in different buffer solutions (PBS - 100 mM, pH 7.2 and COLLAGENASE, 50 mM Tris, pH 7.5) incubation time was until one week. The results showed that the molecular profiles, the biological activities and antigenicity of toxins from *B. atrox* autoproteolysed second incubation time were strongly influenced by the constituents of the buffer solutions used in the experimental process. Brij 35, a constituent of the buffer COLLAGENASE, protected mainly from proteolytic degradation and freeze-thaw, the PI class metalloproteinase (23 kDa) and P-III (50 kDa) of the venom, preserving the structure / biological function of them, thus influencing the high hemorrhagic activity, toxicity and lethality of the venom. The venom of *B. atrox* autoproteolysed in PBS showed decay total amount of the toxin as seen in the molecular profiles, and rapid degradation of hemorrhagic metalloproteinase-class P-III, during the time of incubation at 37°C, causes higher decay hemorrhagic, proteolytic, edema and lethal activities. The experimental hyperimmune serum obtained by using as antigen a sample of *B. atrox* venom autoproteolysed for a week at 37°C in PBS showed satisfactory efficacy neutralizing activity of hemorrhagic, proteolytic and lethal activities from *in natura* *B. atrox* venom, and also low toxicity in the process of immunization of laboratory animals. The results suggest the purification of non-toxic peptides/proteins from *B. atrox* venom proteolysis at 37 °C by their own proteases for a week in PBS buffer (100 mM), pH 7.2 evaluating its antigenic activity generating subsidies for vaccine production / specific antivenom against the venom of the Amazonian snake *B. atrox*.

Keywords: *Bothrops atrox*, autoproteolysis, physical-chemical, toxicity, serum hyperimmune experimental, vaccine antivenom.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Serpentes peçonhentas do Brasil.....	14
1.2 Acidentes Ofídicos no Brasil.....	16
1.3 O gênero <i>Bothrops</i>	17
1.4 <i>Bothrops atrox</i> (Linnaeus, 1758).....	19
1.5 Soroterapia.....	20
1.6 Proteínas.....	21
1.7 Proteínas e estado conformacional.....	21
1.8 Fatores físico-químicos que podem alterar a atividade biológica das proteínas.....	23
1.9 Estudo sobre a autoproteólise de veneno de serpentes.....	23
1.10 Resposta imunológica.....	24
1.10.1 Componentes do sistema imunitário.....	25
1.10.2 A imunidade e a resposta imune.....	27
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Veneno de serpente.....	33
3.2 Determinação da concentração de proteínas.....	33
3.3 Animais de laboratório.....	33
3.4 Indução de autoproteólise.....	33
3.5 Caracterização do perfil molecular do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	34
3.5.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE.....	34
3.5.2 Zimograma da atividade proteolítica.....	34
3.5.3 Eletroforese Bidimensional.....	35
3.5.4 Eletroforese Tris-Tricina – PAGE-SDS.....	35
3.6 Análise imunológica por <i>Western blotting</i>	36
3.7 Caracterização da atividade biológica do veneno de <i>B. atrox</i>	37
3.7.1 Avaliação da Atividade Fosfolipásica (A ₂).....	37
3.7.2 Determinação da Atividade das Metaloproteinases (MPs).....	38
3.7.3 Avaliação da Atividade coagulante.....	38

3.7.4 Avaliação da atividade hemorrágica <i>in vivo</i>	39
3.7.5 Avaliação da Atividade Desfibrinogenante.....	39
3.7.6 Avaliação da indução de Edema.....	39
3.7.7 Avaliação da Letalidade do veneno autoproteolizado.....	40
3.8 Imunização de animais experimentais - Produção de plasma hiperimune experimental.....	40
3.9 Avaliação da Eficácia Neutralizante (resposta imune).....	40
3.9.1 Avaliação da Neutralização da Atividade Hemorrágica.....	40
3.9.2 Avaliação da Neutralização da Atividade Fosfolipásica A ₂	41
3.9.3 Avaliação da Neutralização da Atividade Coagulante.....	41
3.9.4 Avaliação da Neutralização da Atividade Desfibrinogenante.....	41
3.9.5 Avaliação preliminar da neutralização da letalidade do veneno <i>in natura</i> de <i>B. atrox</i> em camundongos imunizados com veneno não autoproteolizado (T0) e autoproteolizado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (100 mM) pH 7,2.....	42
4.0 RESULTADOS.....	43
4.1 Caracterização do Perfil Molecular do veneno de <i>B. atrox</i>	43
4.1.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS-PAGE.....	43
4.1.1.1 Venenos autoproteolizados em tampão PBS (100 mM) pH 7,2.....	43
4.1.1.2 Venenos autoproteolizados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	45
4.1.2 Eletroforese Bidimensional.....	47
4.1.2.1 Venenos autoproteolizados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	47
4.1.2.2 Venenos autoproteolizados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	49
4.2 Caracterização das atividades biológicas do veneno de <i>B. atrox</i>	51
4.2.1 Avaliação da Atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂).....	51
4.2.1.1 Venenos autoproteolizados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	52
4.2.1.2 Venenos autoproteolizados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	53
4.2.2 Zimograma da Atividade Proteolítica.....	55
4.2.3 Determinação da Atividade das Metaloproteinases (MPs) - Atividade Gelatinase.....	57
4.2.3.1 Venenos autoproteolizados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	58
4.2.3.2 Venenos autoproteolizados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	59
4.2.4 Avaliação da atividade hemorrágica <i>in vivo</i>	61
4.2.5 Avaliação da Atividade Coagulante.....	63
4.2.5.1 Venenos autoproteolizados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	63
4.2.5.2 Venenos autoproteolizados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	63

4.2.6 Avaliação da Atividade Desfibrinogenante.....	64
4.2.6.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	64
4.2.7 Avaliação da indução de Edema.....	65
4.2.7.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	65
4.2.7.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	66
4.2.8 Avaliação da Letalidade do veneno autoproteolisado.....	68
4.2.8.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	68
4.2.8.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	69
4.3 Imunização de animais de laboratório - Produção de plasma hiperimune experimental.....	70
4.4 Análise imunológica por <i>Western blotting</i>	71
4.4.1 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5.....	71
4.4.1.1 <i>Western blotting</i> com soro antibotrópico.....	71
4.4.2 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2.....	72
4.4.2.1 <i>Western blotting</i> com soro antibotrópico.....	72
4.4.2.2 <i>Western blotting</i> com soro hiperimunes experimentais.....	73
4.5 Avaliação da Eficácia Neutralizante dos soros hiperimunes experimentais.....	74
4.5.1 Avaliação da Neutralização da Atividade Hemorrágica.....	74
4.5.2 Avaliação da Neutralização da Atividade Fosfolipásica A ₂	76
4.5.3 Neutralização da Atividade Coagulante.....	77
4.5.4 Avaliação da Neutralização da Atividade Desfibrinogenante.....	78
4.5.5 Avaliação preliminar da neutralização da letalidade do veneno <i>in natura</i> de <i>B. atrox</i> em camundongos imunizados com veneno não autoproteolisado (T0) e autoproteolisado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (100 mM) pH 7,2.....	78
5.0 DISCUSSÃO.....	80
5.1 Efeitos da autoproteólise e de fatores físico-químicos nas atividades biológicas das toxinas do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	80
5.2 Efeitos da autoproteólise e de fatores físico-químicos na antigenicidade das toxinas do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	88
6.0 CONCLUSÃO.....	93
7.0 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	95
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Resumo da composição bioquímica do veneno botrópico.....	18
Tabela 02 – Atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂) do veneno incubado de <i>B. atrox</i> por uma semana a 37°C em tampão PBS.....	52
Tabela 03 – Atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂) do veneno incubado de <i>B. atrox</i> por uma semana a 37°C em tampão COLAGENASE.....	53
Tabela 04– Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina do veneno de <i>B. atrox</i> , segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.....	58
Tabela 05 – Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina do veneno de <i>B. atrox</i> , segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.....	59
Tabela 06 – Atividade hemorrágica segundo o tempo de incubação do veneno autoproteolizado de <i>B. atrox</i> segundo o tampão utilizado.....	61
Tabela 07 – Atividade coagulante do veneno de <i>B. atrox</i> , segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.....	63
Tabela 08 – Atividade coagulante do veneno de <i>B. atrox</i> , segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.....	64
Tabela 09 – Atividade edematogênica do veneno de <i>B. atrox</i> , segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.....	65
Tabela 10 – Atividade edematogênica do veneno de <i>B. atrox</i> , segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.....	67
Tabela 11 – Neutralização da atividade hemorrágica pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolizado de <i>B. atrox</i> em tampão PBS.....	75
Tabela 12 – Neutralização da atividade hemorrágica pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolizado de <i>B. atrox</i> em tampão COLAGENASE.....	75
Tabela 13 – Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolizado de <i>B. atrox</i> em tampão PBS.....	76
Tabela 14 – Neutralização da atividade coagulante pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolizado de <i>B. atrox</i> em tampão PBS.....	77
Tabela 15 – Neutralização da atividade desfibrinogenante do veneno de <i>B. atrox</i>	78
Tabela 16 – Avaliação preliminar da neutralização da letalidade do veneno <i>in natura</i> de <i>B. atrox</i> em camundongos imunizados com veneno não autoproteolizado (T0) e autoproteolizado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (100 mM) pH 7,2.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Serpentes peçonhentas que mais causam acidentes no Brasil.....	16
Gráfico 02 – Cinética da atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂) do veneno autoproteolisado de <i>B. atrox</i> segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.....	54
Gráfico 03 – Cinética da atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂) do veneno autoproteolisado de <i>B. atrox</i> segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.....	54
Gráfico 04 – Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina do veneno autoproteolisado de <i>B. atrox</i> segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.....	60
Gráfico 05 – Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina do veneno autoproteolisado de <i>B. atrox</i> segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.....	60
Gráfico 06 – Atividade edematogênica do veneno (10 µg) autoproteolisado a 37°C de <i>B. atrox</i> por uma semana em tampão PBS: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h).....	66
Gráfico 07 – Atividade edematogênica do veneno (10 µg) autoproteolisado a 37°C de <i>B. atrox</i> por uma semana em tampão COLAGENASE: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h).....	67
Gráfico 08 – Avaliação da letalidade após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (500 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão PBS.....	68
Gráfico 09 – Avaliação da letalidade após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (500 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão COLAGENASE.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Árvore filogenética das famílias das serpentes brasileiras.....	14
Figura 02 - Diferenças entre serpentes peçonhentas e não peçonhenta....	16
Figura 03 - Acidente botrópico.....	19
Figura 04 - <i>B. atrox</i> e sua incidência no Brasil.....	20
Figura 05 - Estruturas protéicas.....	22
Figura 06 - Tipos de epítomos	25
Figura 07 - Estrutura de um anticorpo	26
Figura 08 - Reconhecimento de antígenos.....	29
Figura 09 - Esquema do funcionamento do sistema imune	31
Figura 10 - Perfis eletroforéticos após diferentes tempos de incubação a 37 °C das amostras do veneno (40 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão PBS.....	44
Figura 11- Perfis eletroforéticos após diferentes tempos de incubação a 37 °C das amostras do veneno (40 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão COLAGENASE.....	46
Figura 12 - Perfil eletroforético Bidimensional após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (500 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão PBS.	47
Figura 13 - Perfil eletroforético Bidimensional após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (500 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão COLAGENASE.....	49
Figura 14 - Atividade Fosfolipásica A_2 após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão PBS...:	52
Figura 15 - Atividade Fosfolipásica A_2 após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão COLAGENASE.....	53
Figura 16 - Zimograma da atividade proteolítica após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (40 µg) de <i>B. atrox</i> com os tampões PBS (A) e COLAGENASE (B), em condições não reduzidas.....	56
Figura 17 - Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão PBS.....	58
Figura 18 - Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão COLAGENASE.....	59
Figura 19 - Atividade hemorrágica após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> após autoproteólise em tampão PBS (A) e COLAGENASE (B):.....	61

Figura 20 - Edema no coxim da pata de camundongos após uma hora de injeção das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> após autoproteólise em tampão PBS.....	65
Figura 21 - Edema no coxim da pata de camundongos após uma hora de injeção das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> após autoproteólise em tampão COLAGENASE.....	66
Figura 22 - Produção de plasma hiperimune experimental.....	70
Figura 23 - (A) Perfil eletroforético Tris-Tricina com glicerol – SDS-PAGE após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (40 µg) de <i>B. atrox</i> em tampão COLAGENASE em condições não redutoras: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (1 semana). Gel corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> . (B) Imunoperfis com anticorpos policlonais do soro antitoxêmico de cavalo (INSTITUTO BUTANTAN). Uso padrão dos marcadores de massa molecular do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	71
Figura 24 - (A) Perfil eletroforético Tris-Tricina com glicerol– SDS-PAGE após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (40 µg) de <i>B. atrox</i> com tampão PBS em condições não redutoras: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (1 semana). Gel corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> . (B) Imunoperfis com anticorpos policlonais do soro antitoxêmico de cavalo (INSTITUTO BUTANTAN). Uso padrão dos marcadores de massa molecular do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	72
Figura 25 - Imunoperfis com anticorpos policlonais de soro hiperimune experimental de camundongos imunizados com veneno de <i>B. atrox</i> T0 (A) e T6 (B). Em condições não redutoras (NR) e redutoras (R). Amostras de veneno (40 µg) de <i>B. atrox</i> , T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (1 semana). Uso padrão dos marcadores de massa molecular do veneno de <i>Bothrops atrox</i> .	73
Figura 26 - Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>B. atrox</i> (10 µg) com os soros hiperimunes experimentais (3:1).....	74
Figura 27 - Fórmula estrutural do brij 35: (C ₂ H ₄ O) ₂₃ C ₁₂ H ₂₅ OH).....	85
Figura 28 - Atividade hemorrágica após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de <i>B. atrox</i> após autoproteólise em tampão PBS com Brij 35: T0 (zero h), T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (1 semana). Controle: veneno tempo zero (T0).....	87

1. INTRODUÇÃO

Serpentes são animais vertebrados que pertencem ao grupo dos répteis, possuem o corpo coberto de escamas, às vezes com aspecto brilhante ou opaco, ou ainda uma aspereza quando tocadas. As serpentes como outros répteis não conseguem controlar a temperatura de seu corpo (ectotérmicos), sendo conhecidos como animais de sangue frio. Isso implica que ao tato elas pareçam frias, pois sua temperatura é muito próxima à do meio ambiente em que elas se encontram (CANTER *et al.*, 2008).

As serpentes podem ser classificadas em dois grupos: as peçonhentas, isto é, aquelas que possuem glândulas especializadas na produção e armazenamento de substâncias tóxicas, e conseguem inocular seu veneno no corpo da presa, e as não peçonhentas (SOERENSEN, 2000).

1.1 Serpentes peçonhentas do Brasil

O Brasil possui uma fauna de serpentes composta por aproximadamente 365 espécies, classificadas em 9 famílias. Destas, apenas duas famílias (Elapidae e Viperidae) congregam as espécies peçonhentas. A família Viperidae possui 28 espécies e a família Elapidae 27 (Figura 01) (BÉRNILS, 2009).

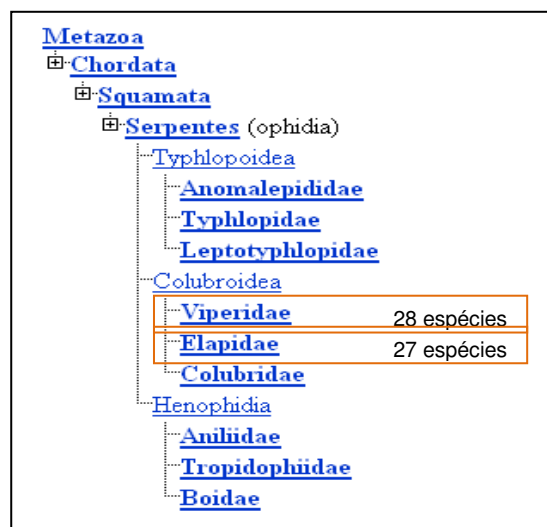


Figura 01 - Árvore filogenética das famílias das serpentes brasileiras. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>.

Os aspectos normalmente característicos das serpentes peçonhentas são: cabeça triangular; cauda terminando abruptamente; escamas ásperas e sem brilho; olhos com pupila em fenda; e presença de **fosseta loreal**, que é um orifício entre o olho e a narina da serpente. Ele é utilizado para perceber a presença de calor, o que permite à serpente caçar no escuro presas que tenham corpo quente (homeotérmicas), tais como mamíferos e aves. A única exceção para essa regra é a cobra-coral (*Micrurus sp*) (CANTER *et al.*, 2008).

Algumas serpentes com fosseta loreal apresentam um **chocalho** na ponta da cauda, que emite um som característico de alerta quando a serpente é perturbada. Essas são as cascavéis (*Crotalus sp*). As serpentes com fosseta loreal cuja cauda é lisa até a extremidade pertencem à família das jararacas (*Bothrops sp*).

Algumas serpentes com fosseta loreal apresentam a extremidade da cauda com as escamas eriçadas como uma escova. Essas são as chamadas surucucus ou pico-de-jaca (*Lachesis sp*) (PARDAL & YUKI, 2000).

Um dos aspectos que distinguem as serpentes peçonhentas das não peçonhentas é o tipo de dentição. No grupo das **não peçonhentas**, dois tipos básicos são observados: um onde o animal possui muitos dentes fixos, pequenos e maciços que recebe o nome de dentição **áglifa**; e outra onde além desses dentes fixos, pequenos e maciços, observa-se ao fundo da boca um par de dentes mais longos, com sulcos, por onde a saliva da serpente pode escorrer e penetrar na presa quando ela a morde, a chamada dentição **opistóglifa** (CANTER *et al.*, 2008).

Dentre as **serpentes peçonhentas** também existem dois tipos distintos: uma delas possui um par de dentes dianteiro que injeta o veneno, fixo, pequeno e semi-canalculado e pouco se destaca dos demais dentes maciços e menores. Este tipo é denominado dentição **proteróglifa**, típico das *Micrurus sp*; no segundo tipo os dentes fixos são menores e em pequeno número, destacando-se os que injetam o veneno, que são longos, dianteiros, completamente canalculados, (semelhantes a uma agulha de injeção), curvados para trás quando a serpente está com a boca fechada, e capazes de mover-se para frente no momento em que ela desfere o bote.

Esta última é denominada dentição **solenóglifa** (Figura 02), e possuem esse tipo de dentição as *Crotalus sp*, *Bothrops sp* e *Lachesis sp* (MELGAREJO, 2003).

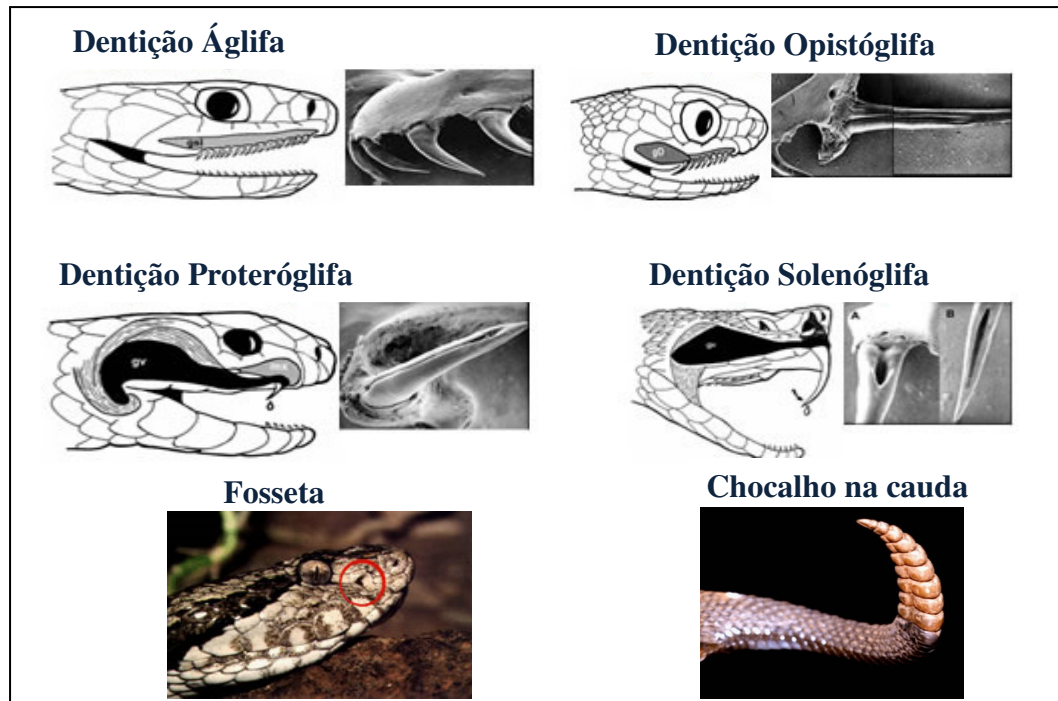


Figura 02 – Diferenças entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas (MELGAREJO, 2003).

1.2 Acidentes Ofídicos no Brasil

Os acidentes ofídicos por serpentes peçonhentas no Brasil são causados, na grande maioria, por serpentes conhecidas como "jararacas" (*Bothrops sp*), seguidos dos acidentes por "cascavéis" (*Crotalus sp*), "surucucus" (*Lachesis sp*), e pelas "corais verdadeiras" (*Micrurus sp*), conforme pode ser observado no gráfico 01.

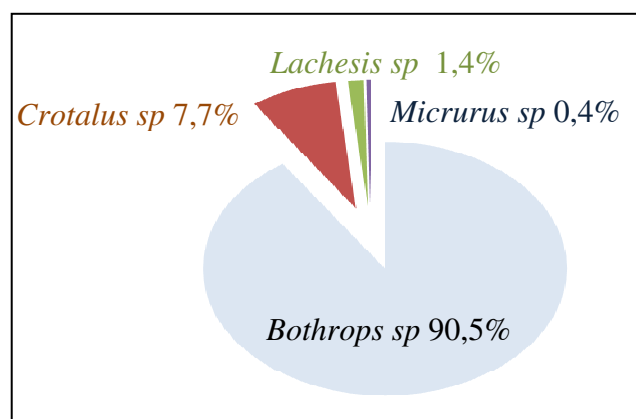


Gráfico 01 – Serpentes peçonhentas que mais causam acidentes no Brasil (BRASIL, 2001).

1.3 O gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* está distribuído por todo o território nacional sendo responsável pela maioria dos acidentes. São conhecidas popularmente por jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeiro, caiçara, e outras denominações. Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais, preferindo ambientes úmidos e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores, e possuem hábitos predominantemente noturnos (MELGAREJO, 2003).

A variabilidade nas atividades biológicas dos venenos de serpentes é devida à diversidade bioquímica de seus componentes, principalmente de proteínas e peptídeos, que se manifestam em uma ampla variedade de ações fisiopatológicas, como: coagulantes, hemorrágicas, necrosantes, miotóxicas, hemolíticas, cardiotoxícas/citotoxícas (BOLAÑOS, 1984; ROSENFELD, 1971; TU, 1996). As atividades são decorrentes das propriedades biológicas de uma ou mais frações que podem manifestar-se a nível local e/ou sistêmico após o envenenamento (FRANÇA & FAN, 1992; GUTIERREZ & LOMONTE, 1995).

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem venenos com ação anticoagulante induzindo a ativação da cascata da coagulação, cujo resultado final será o consumo de alguns fatores da coagulação (produzindo incoagulabilidade sanguínea), proteolítica e hemorragia (local e sistêmica), caracterizando clinicamente necrose, hemorragia e edema, processo que se desenvolve rapidamente após a inoculação do veneno (Tabela 01) (CASTRO, 2006; SOUZA *et al.*, 2000).

Tabela 01 – Resumo da composição bioquímica do veneno botrópico. Principais frações protéicas, não-protéicas e peptídicas identificadas no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

PRINCIPAIS COMPONENTES BIOATIVOS DO VENENO BOTRÓPICO		
	ENZIMÁTICOS	NÃO ENZIMÁTICOS
	PROTÉICOS	Fosfolipases A2 Fosfoesterases L-aminoácido oxidase Acetilcolinesterase Serinoprotease Metaloprotease Hialuronidades Aminotransferases Cininogenases Ativadores de fator X
	ORGÂNICOS	INORGÂNICOS
	NÃO PROTÉICOS	Aminas biogênicas Carboidratos Aminoácidos Citratos Nucleotídeos
PEPTÍDICOS	Citotóxico Miotóxico Desintegrinas	Potenciadores de bradicinina Natriuréticos Cardiotóxico

Fonte: IWAANAGA & SUZUKI, 1979; MARKLAND, 1998.

A miotoxidade é causada pela ação direta de miotoxinas sobre a membrana plasmática das células musculares e indiretamente, pelo desenvolvimento de isquemia resultante de drásticas alterações induzidas por estes venenos sobre a microvasculatura e artérias intramusculares. Com relação as miotoxinas, há um grupo de componentes intimamente relacionados causadores de dano muscular que

podem ser classificados como “miotoxinas com estrutura enzimática de fosfolipase A₂”, embora alguns deles careçam desse efeito enzimático (SOUZA *et al.*, 2000).

A hemorragia local e/ou sistêmica no envenenamento botrópico resulta principalmente da ação de metaloproteínases que agem diretamente sobre os capilares induzindo extravasamento sanguíneo. O edema local é também uma característica induzida pelos venenos botrópicos. Este efeito é devido à ação direta de componentes do veneno sobre a microvasculatura, aumentando a permeabilidade de capilares e vênulas e efeito de mediadores pró-inflamatórios endógenos liberados por componentes do veneno (ROSENFELD, 1971).

Além do edema, a inoculação de veneno botrópico produz um grande processo inflamatório, ocasionando frequentemente sequelas como a perda de tecidos ou amputação da parte afetada (Figura 03) (ROSENFELD, 1971; GUTIERREZ & LOMONTE, 1989; LOMONTE, 1994; BRASIL, 1998).



Figura 03 – Acidente Botrópico. Quadro clínico: Edema, eritema, equimose (1), bolhas (2), amputação (3), síndrome compartimental (4 e 5) e necrose (6) (INSTITUTO BUTANTAN; NORRIS, 2004).

1.4 *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758)

A serpente é conhecida popularmente como jararaca da Amazônia, caiçaca, cambéua, cambóia dentre outros nomes. Possui principalmente hábitos terrícolas, é vivípara e se alimenta de anfíbios, cobras, lagartos, pequenas aves e pequenos mamíferos. Seu tamanho pode chegar a 150 cm (Figura 04) (SILVA, 2006).

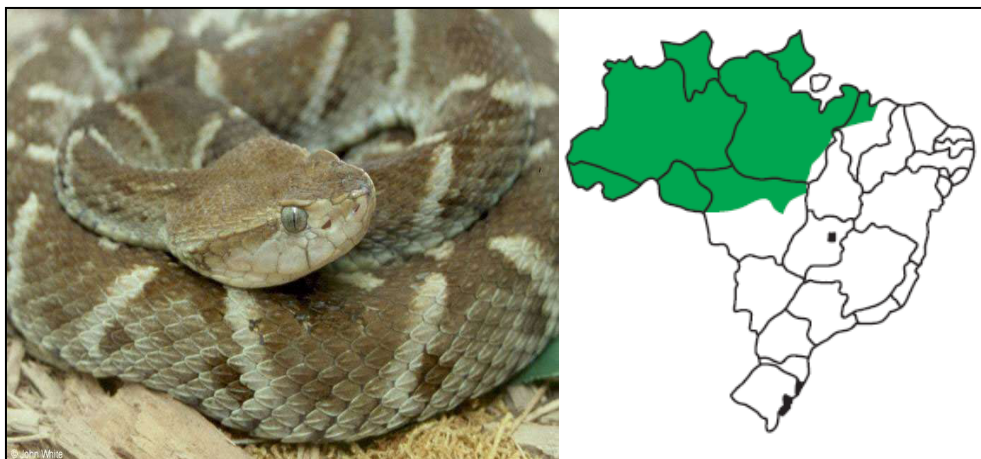


Figura 04 – *B. atrox* e sua incidência no Brasil (SOUZA, 2000).

Dos 2636 acidentes ofídicos atendidos em Manaus entre 1986 de 1999 (Figura 04), mais de 90% dos acidentes foram ocasionados por espécies de *B. atrox* (fonte: banco de dados da Gerência de Animais Peçonhentos – FMT-AM). Como em todo o país, apesar do número considerável de casos e da gravidade destes acidentes, a taxa de letalidade é baixa, com um valor de 0,7% (FMT-AM, 1995).

1.5 Soroterapia

O tratamento de acidentes por animais peçonhentos consiste na administração, o mais precocemente possível, do soro antiveneno específico (BRASIL, 1998).

O soro antibotrópico é obtido através da imunização de cavalos com uma mistura de veneno de serpentes *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), *Bothrops neuwiedii* (12,5%) e *Bothrops alternatus* (12,5%). O cavalo, pelo seu grande porte, permite a coleta de grandes volumes de plasma, ricos em anticorpos antiveneno. Contudo, estes animais apresentam decaimento de sua resistência orgânica que pode resultar em óbito (10% dos animais utilizados na produção de soro morrem durante o processo de imunização) devido à alta toxicidade do veneno e também pela utilização de adjuvantes tóxicos (NASCIMENTO *et al.*, 1997). Os laboratórios que produzem esses imunoderivados no Brasil são: Instituto Butantan (São Paulo), Fundação

Ezequiel Dias (Minas Gerais) e Instituto Vital Brasil (Rio de Janeiro), todos em convênio com o Ministério da Saúde.

Se a administração do antiveneno é rapidamente iniciada após o envenenamento, a neutralização dos efeitos sistêmicos é geralmente obtida com sucesso, mas a neutralização dos danos teciduais locais é tarefa mais difícil. Em muitos casos de acidente ofídico, a carência de neutralização dos efeitos locais resulta em permanente sequela, isto é, perda de tecido (GUTIERREZ & LOMONTE, 1989).

1.6 Proteínas

As Proteínas são compostos orgânicos de estrutura complexa e massa molecular elevada, sintetizadas pelos organismos vivos através da condensação de um grande número de moléculas de L- alfa-aminoácidos, através de ligações denominadas ligações peptídicas. Uma proteína é um conjunto de 100 ou mais resíduos de aminoácidos, sendo as moléculas menores denominados peptídeos (NELSON & COX, 2004).

As proteínas podem ser agrupadas em várias categorias de acordo com a sua função. De uma maneira geral, as proteínas desempenham nos seres vivos as seguintes funções: estrutural, enzimática, hormonal, defesa, nutrição, coagulação sanguínea e transporte (ZAHA, A. *et al.*, 2003).

1.7 Proteínas e estado conformacional

As proteínas podem ter até quatro tipos de estruturas; primária, secundária, terciária e algumas proteínas estrutura quaternária (Figura 05), determinadas por processos evolutivos para funções biológicas específicas (ABBAS, 2003, ALBERTS *et al.*, 2004).

A estrutura primária é dada pela sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e inclui todas as ligações dissulfeto. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois ela condiciona o arranjo espacial da molécula. Sua

estrutura é somente a sequência dos resíduos de aminoácidos, sem se preocupar com a orientação espacial do *backbone* da cadeia polipeptídica e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (ABBAS, 2000).

A estrutura secundária é dada pelo arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína. Ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos α dos L-aminoácidos e seus grupamentos amina e carboxila que formam o *backbone* da cadeia polipeptídica. Estas interações, formando α -hélice ou folha- β , acontecem unicamente por pontes de hidrogênio (JANEWAY, 2006).

A estrutura terciária resulta do dobramento final do *backbone* de uma cadeia polipeptídica associado com as interações de regiões das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos distantes na estrutura primária, seja por ligações não covalentes e ligações de pontes de dissulfeto. Esta estrutura é também conhecida como estrutura tridimensional de uma cadeia polipeptídica (ROITT, 2004).

Algumas proteínas podem ter duas ou mais cadeias polipeptídicas em estrutura terciária formando a estrutura quaternária. Elas são estabilizadas pelas mesmas interações que acontecem na estrutura terciária (NELSON & COX, 2004).

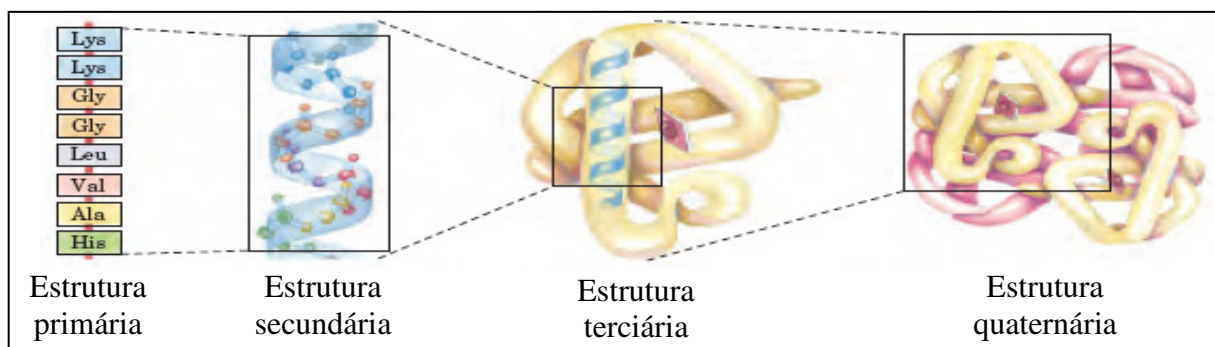


Figura 05 - Estruturas protéicas (NELSON & COX, 2004).

A função específica de uma proteína está associada a regiões específicas de sua estrutura tridimensional, denominadas domínios. Os domínios podem apresentar diferentes estados de distribuição espacial de seus átomos (estado conformacional),

mas só determinado estado conformacional confere função biológica à proteína (NELSON & COX, 2004).

1.8 Fatores físico-químicos que podem alterar a atividade biológica das proteínas

Para que uma proteína perca sua atividade biológica (função), deve ser alterado seu estado conformacional nativo, processo conhecido como desnaturação, que pode ser reversível ou irreversível, dependendo da estrutura da proteína e dos agentes desnaturantes (proteólise, temperatura, pH, solventes orgânicos, sais inorgânicos, detergentes, etc.) (ROITT, 2004).

Proteólise é o processo de degradação (digestão) de proteínas por enzimas chamadas proteases, resultando em peptídeos e aminoácidos que podem ser reaproveitados na síntese protéica. A proteólise também ocorre na ativação ou liberação de algumas moléculas (proteólise limitada), e muitas enzimas são ativadas pela ação proteolítica sobre seu precursor, chamado pró-enzima mudando de um estado conformacional sem função biológica para outro estado conformacional com função biológica específica (ZAHA *et al.*, 2003; ALBERTS *et al.*, 2004).

1.9 Estudos sobre a autoproteólise de veneno de serpentes

Sousa *et al.* (2001), submeteram o veneno da serpente *Bothrops jararaca* a autoproteólise por 48 horas em água (pH 5,0) e Tris-HCl 5mM (pH 8,5), verificando-se mudanças significativas na atividade proteolítica, nos perfis moleculares e nas atividades biológicas quando comparados. A análise dos padrões eletroforéticos das amostras de veneno pré-incubadas em pH 5,0 mostrou-se relativamente estável, enquanto as amostras pré-incubadas em pH 8,5 apresentaram progressivo desaparecimento das proteínas de 45 a 66 kDa e o aumento das proteínas de 14 a 29 kDa. A atividade hemaglutinante diminuiu 93% após 24 h de incubação em pH 8,5, e não houve alterações detectáveis em pH 5,0. A incubação das amostras de veneno causou um aumento progressivo de fosfolipase A₂ e atividades pró-coagulantes foi mais evidente nas amostras incubadas em pH 5,0. O reconhecimento das amostras de veneno por anticorpos policlonais contra o veneno

bruto foi progressivamente perdido durante a incubação, tanto a pH 5,0 e 8,5; (SOUZA *et al.*, 2001).

López-Lozano *et al.* (2002), verificaram que o perfil molecular (através de eletroforese SDS-PAGE) do veneno da serpente *Bothrops atrox*, submetidos a autoproteólise por até 24 h, foi alterado de acordo com o tempo de autoproteólise. A análise dos padrões eletroforéticos das amostras de veneno incubado em tampão PBS (0,01 M), pH 7,4 por 24 h mostrou que a proteína de 50 kDa foi degradada, e uma nova proteína de 27 kDa foi detectada. Também foi detectada a diminuição na intensidade da proteína de 23 kDa (LÓPEZ-LOZANO *et al.*, 2002).

1.10 Resposta imunológica

As proteínas que possuem função de defesa são capazes de "reconhecer" proteínas "estranhas" que são chamadas de antígenos. Na presença dos antígenos o organismo produz proteínas de defesa, denominadas anticorpos. O anticorpo é altamente específico e combina-se com o antígeno de maneira a neutralizar seu efeito (BIER, 2003).

Epítopo é a parte de um antígeno capaz de estimular resposta imunológica e é reconhecido pelo anticorpo específico. São áreas nas moléculas dos antígenos que se ligam aos receptores celulares e aos anticorpos. Um antígeno possui vários epítomos, e esses epítomos podem ser lineares ou conformacionais (PEAKMAN *et al.*, 1999).

Epítomos conformacionais (Figura 06-A) são aqueles formados de uma forma não linear, tendo pontos distintos da sequência da proteína, porém próximos em uma forma tridimensional, ou seja, formados pelo dobramento tridimensional normal de uma macromolécula. Eles perdem suas funções de epítomos se desnaturados (NELSON & COX, 2004).

Epítomos lineares (Figura 06-B) são aqueles formados por resíduos dispostos sequencialmente de maneira linear em um antígeno protéico ou polissacarídeo. Não são afetados por nenhum tratamento físico (pH e temperatura) ou químico (solventes

orgânicos) que altere a estrutura tridimensional da macromolécula (SCHARON, 2000).

Quando uma proteína sofre autoproteólise ou pela ação dos fatores físico-químicos (mudanças de pH, temperatura, composição do solvente e o tempo de duração do efeito), sua estrutura tridimensional modifica-se surgindo epítopos neoantigênicos (Figura 06-C) (FRAGA, 1998).

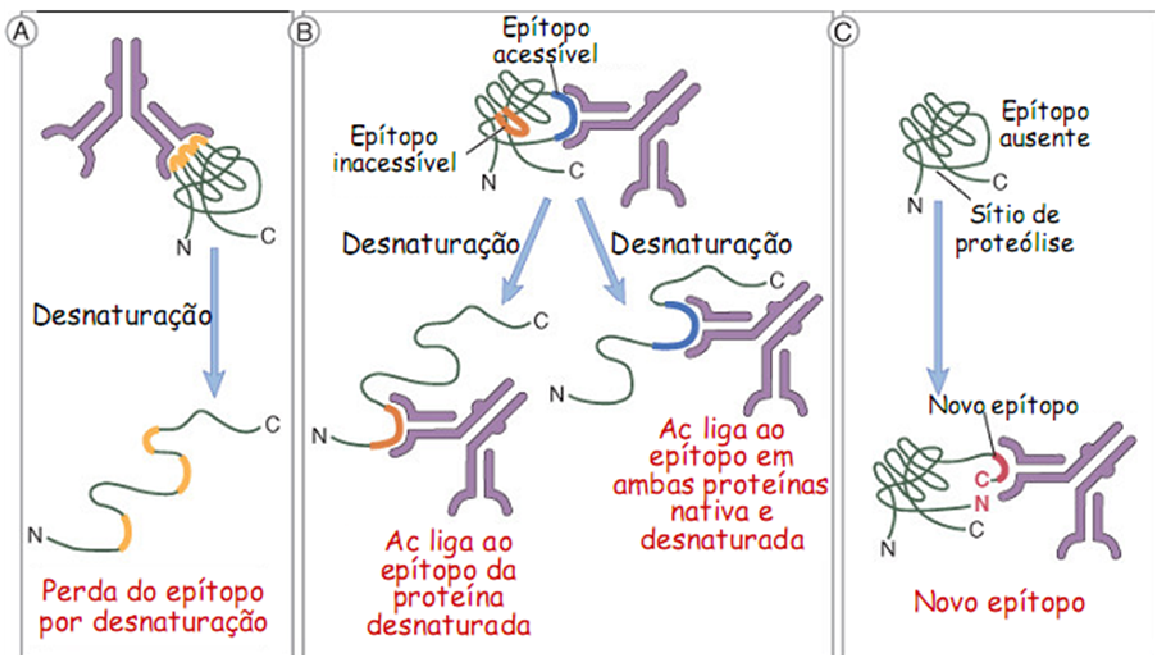


Figura 06 - Tipos de epítopos: (A) Epítipo conformacional. (B) Epítipo linear. (C) Epítipo neoantigênico (ABBAS, 2003).

1.10.1 Componentes do sistema imunitário

O sistema imunitário é composto por células e substâncias solúveis. As células mais importantes do sistema imunitário são os glóbulos brancos. Os macrófagos, neutrófilos e linfócitos (B, T citotóxicos e T auxiliares) são tipos diferentes de glóbulos brancos. As substâncias solúveis são moléculas que não fazem parte das células, mas que se dissolvem em um líquido como o plasma. As substâncias solúveis mais importantes são os anticorpos, as proteínas do sistema do complemento e as citocinas. Algumas substâncias solúveis atuam como mensageiros para atrair e ativar outras células (SCHARON, 2000).

Quando são estimulados por um antígeno, os linfócitos B amadurecem até se converterem em células que formam anticorpos. Os anticorpos são proteínas que interagem com o antígeno que inicialmente estimula os linfócitos B. Os anticorpos também recebem o nome de imunoglobulinas (ABBAS, 2003).

Cada molécula de anticorpo (Figura 07) tem uma parte específica, região variável que se liga a um epítipo específico do antígeno e outra região constante, cuja estrutura determina a classe do anticorpo. Existem cinco classes de anticorpos: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD (CALICH, 2001).

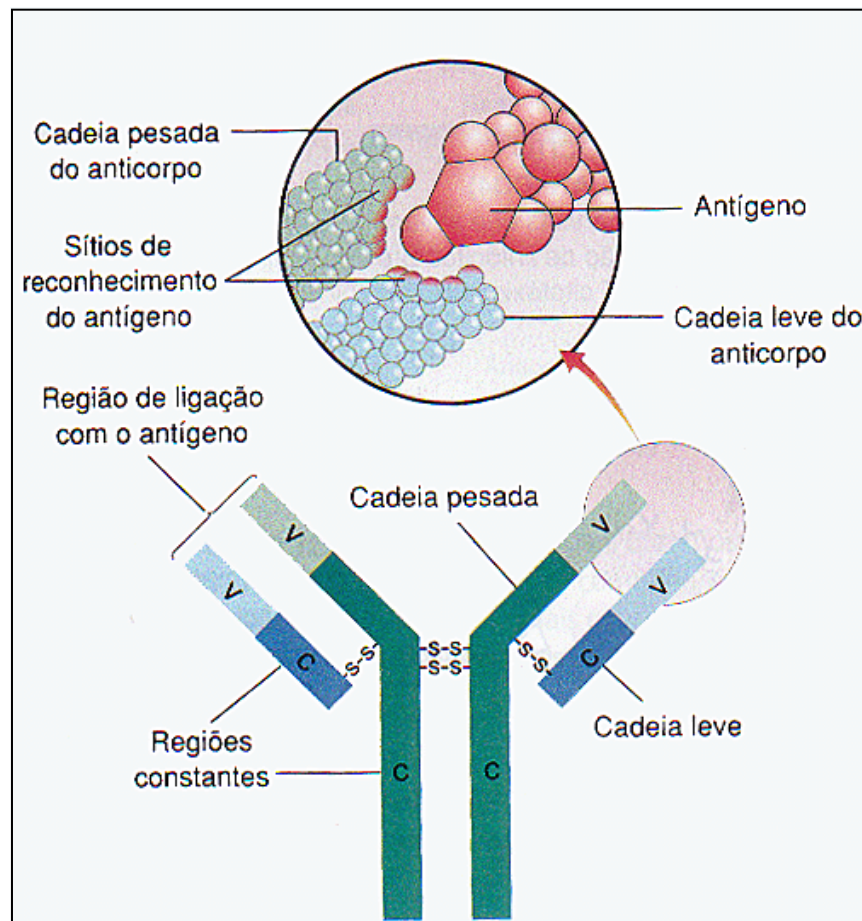


Figura 07 – Estrutura de um anticorpo IgG (AMABIS & MARTHO, 2004).

A IgM expressa na superfície das células B, elimina patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B antes que haja IgG suficiente. A IgA é encontrada em áreas de mucosas, como os intestinos, trato respiratório e trato urogenital, prevenindo sua colonização por patógenos. A IgD funciona

principalmente como um receptor de antígeno nas células B e suas funções são menos definidas do que as dos outros isotipos. A IgE se liga a alérgenos e desencadeia a liberação de histaminas dos mastócitos, também estando envolvido na alergia, e também protege contra vermes parasitas. A IgG é o tipo de anticorpo mais frequente, só se produz depois de várias exposições a um antígeno. A IgG encontra-se tanto no sangue como nos tecidos. Esta resposta secundária de anticorpos é mais rápida e abundante do que a resposta primária (PARHAM, 2001).

O sistema do complemento engloba mais de 18 proteínas. Essas proteínas atuam em cadeia, isto é, uma ativa a seguinte. O sistema do complemento pode ser ativado por meio de duas vias diferentes. Uma delas, chamada de via alternativa, é ativada por certos produtos microbianos ou antígenos. A outra via, chamada clássica, é ativada por anticorpos específicos ligados aos seus antígenos (complexos imunes). O sistema do complemento destrói substâncias estranhas, diretamente ou em conjunção com outros componentes do sistema imunitário (ABBAS, 2003).

As citocinas comportam-se como os mensageiros do sistema imunitário e são secretadas por células do sistema imunitário em resposta a uma estimulação.

Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), também chamados antígenos leucocitários humanos (HLA) possuem como função básica promover o reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T (FRAGA & NEUMANN, 1998).

Existem dois tipos de moléculas do MCH: as da classe I (presente em todas as células nucleares e plaquetas) e as da classe II encontradas apenas em linfócitos B, macrófagos e linfócitos T quando ativados (PHELAN, 1999).

1.10.2 A imunidade e a resposta imune

O sistema imunitário pode ser dividido em duas categorias: imunidade celular e humoral. Todas as pessoas nascem com imunidade celular. Os componentes do sistema imunitário que participam na imunidade celular (macrófagos, neutrófilos e

sistema do complemento) reagem de forma semelhante perante todas as substâncias estranhas, e o reconhecimento dos antígenos não varia de indivíduo para indivíduo (ABBAS, 2003; BIER, 2003; PEAKMAN *et al.*, 1999).

A imunidade humoral é adquirida; após o nascimento, o sistema imunitário de um indivíduo ainda não foi confrontado com o mundo exterior nem começou ainda a desenvolver os seus arquivos de memória. O sistema imunitário aprende a responder a cada novo antígeno com que se confronta. Como consequência, a imunidade adquirida é específica para cada antígeno. O traço característico da imunidade específica é a capacidade de aprender, adaptar-se e recordar (efeito memória) (SCROFERNEKER & POHLMANN, 1998).

O sistema imunitário faz um registro ou memória de cada antígeno que o indivíduo encontre, quer seja através dos pulmões (ao respirar), do intestino (ao comer) ou da pele. Isso é possível porque os linfócitos têm uma vida longa. Quando os linfócitos encontram um antígeno pela segunda vez, a sua resposta é enérgica, rápida e específica produzindo antígenos específicos (NELSON & COX, 2004).

A imunidade celular e a imunidade humoral não são independentes uma da outra. Cada sistema atua em relação com o outro e influi sobre ele, direta ou indiretamente, através da indução de citocinas (mensageiros). Raramente um estímulo desencadeia uma só resposta. O que faz é iniciar várias, algumas das quais podem atuar conjuntamente ou ocasionalmente competir entre si. De qualquer forma as respostas dependem sempre dos três princípios básicos do reconhecimento, da mobilização e do ataque (PEAKMAN *et al.*, 1999).

Antes de o sistema imunitário poder responder a um antígeno, deve ser capaz de reconhecê-lo. E, com efeito, pode fazê-lo através de um processo denominado de processamento de antígenos. Os macrófagos são as maiores células processadoras de antígenos, porém existem outras células, incluindo os linfócitos B, que também podem fazê-lo (BIER, 2003).

As células processadoras de antígenos englobam um antígeno e cortam-no em pequenos fragmentos. Em seguida, estes fragmentos são colocados dentro das

moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e lançados para a superfície da membrana celular. O reconhecimento dos antígenos pelo linfócito T ocorre por duas vias distintas; a via citosólica e a endolítica (Figura 08) (SCHARON, 2000).

Na via citosólica, a molécula MHC classe I (MHC I) associa-se ao antígeno endógeno, degradando-o em fragmentos constituídos por poucos aminoácidos. As moléculas MHC classe I passam, então, a expressar, na superfície das células, amostras de seu metabolismo protéico. Se ocorrerem alterações nesses produtos do metabolismo, elas serão reconhecidas pelo sistema imune via linfócito T citotóxico (CD8) (PEAKMAN *et al.*, 1999).

As moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC II) são responsáveis pela via endolítica. O antígeno exógeno, fagocitado pela célula e digerido por enzimas proteolíticas, origina diversos peptídeos que se associam às moléculas MHC II. O complexo formado migra para a superfície da célula onde é reconhecido pelo linfócito T auxiliar (CD4) (NELSON & COX, 2004).

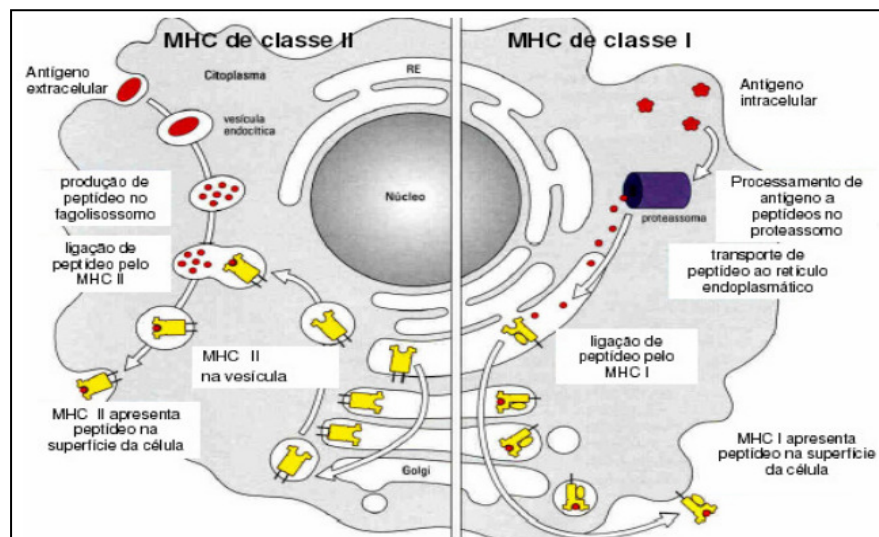


Figura 08 – Reconhecimento de antígenos: Via citosólica (MHC de classe I) e via endolítica (MHC de classe II) (AMABIS & MARTHO, 2004).

Uma vez que uma célula processadora de antígenos e um linfócito T tenham reconhecido um antígeno, uma série de fatos inicia a mobilização do sistema imunitário. Quando uma célula processadora de antígenos absorve um antígeno,

liberta citocinas (por exemplo, interleucina-1, interleucina-8 ou interleucina-12) que atuam sobre outras células. A interleucina-1 mobiliza outros linfócitos T; a interleucina-12 estimula as células NK (*natural killer*, assassinas naturais) para que sejam ainda mais potentes; a interleucina-8 guia os neutrófilos em direção ao local onde foi encontrado o antígeno (SCROFERNEKER & POHLMANN, 1998).

Quando os linfócitos T são estimulados através dos seus receptores de células T, produzem várias citocinas que ajudam a recrutar outros linfócitos, o que amplifica a resposta imune. As citocinas também podem ativar as defesas imunitárias não específicas (celular). Atuam conseqüentemente como uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida (PEAKMAN *et al.*, 1999).

Grande parte dos instrumentos do sistema imunitário tem a finalidade de matar ou eliminar os corpos estranhos uma vez que tenham sido reconhecidos. Os macrófagos, os neutrófilos e as células T citotóxicas (NK-Natural Killer) são capazes de eliminar muitos invasores (Figura 09) (ZAHA *et al.*, 2003; ALBERTS *et al.*, 2004).

Os linfócitos T auxiliares estimulam linfócitos B que irão originar plasmócitos e células B de memória. Os plasmócitos irão secretar anticorpos específicos contra o antígeno, e eles irão reconhecer e ligar-se a antígenos externos para facilitar a fagocitose pelos macrófagos (opsonização), e concomitante a isso, estimulam a liberação de citocinas. Em uma segunda exposição ao antígeno haverá o estímulo de células B e T de memória que irão desencadear a resposta imune de forma mais rápida e específica (Figura 09) (PARHAM, 2001).

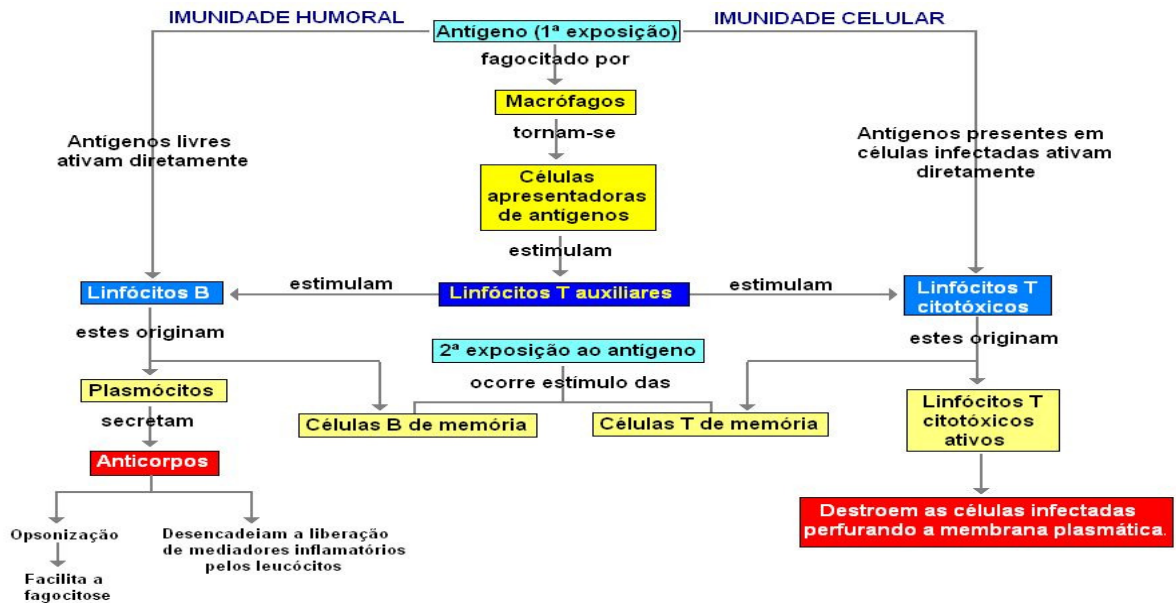


Figura 09 – Esquema do funcionamento do sistema imune (AMABIS & MARTHO, 2004).

Sabe-se que a proteólise e fatores físico-químicos (mudanças de pH, temperatura, composição do solvente e o tempo de duração do efeito), podem afetar a estrutura tridimensional/estado conformacional nativo de uma proteína o que poderia levar ao surgimento de proteínas e peptídeos com atividades biológicas e antigenicidade diferentes da proteína de origem.

Levando-se em consideração que pouco se sabe a cerca da influência dos efeitos da autoproteólise e de fatores físico-químicos sobre as atividades biológicas e antigenicidade das toxinas de *B. atrox*, acredita-se que um estudo a respeito desses efeitos seja significativamente importante com o objetivo de avaliar se o processo de autoproteólise em diferentes condições físico-químicas potencializa ou não as atividades biológicas e a antigenicidade das toxinas, o que consequentemente poderia acarretar na diminuição da toxicidade no processo de imunização, mas mantendo sua antigenicidade e servindo como uma alternativa para a produção de soro hiperimune antibotrópico veterinário e/ou humano específico para acidentes ofídicos causados pela espécie *B. atrox*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as atividades biológicas e a resposta imune de toxinas protéicas do veneno de serpente amazônica *Bothrops atrox* após indução de autoproteólise sobre os seus próprios constituintes em diferentes condições físico-químicas.

2.2 Específicos

- Comparar as atividades biológicas das toxinas do veneno de *B. atrox* após autoproteólise a 37 °C em diferentes tempos de incubação e em diferentes soluções tampão;
- Caracterizar por técnicas proteômicas o perfil molecular das toxinas do veneno de *B. atrox* sob processo de autoproteólise;
- Avaliar *in vivo*, em animais de laboratório, a eficácia da indução da resposta imune das toxinas do veneno da *B. atrox* após autoproteólise em diferentes condições físico-químicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno de serpente

O “pool” de veneno liofilizado de *Bothrops atrox* foi fornecido pelo Banco de Venenos do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Professor Paulo Friedrich Buhrnheim”, da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM).

3.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas (mg/ml) foi determinada usando-se o método de Bradford (1976).

3.3 Animais de laboratório

Para estudos das atividades *in vivo* foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), pesando entre 20 ± 2 g, fornecidos pelo Biotério Experimental do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Professor Paulo Friedrich Buhrnheim”, e mantidos em gaiolas de plástico sob alimentação apropriada *ad libitum* e temperatura devidamente controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$).

3.4 Indução de autoproteólise

O veneno de *B. atrox* ($10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi diluído em tampão PBS (100 mM, azida de sódio 0,02%), pH 7,2 ou em tampão COLAGENASE, pH 7,5 (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl_2 5 mM, CaCl_2 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM) e incubado em banho-maria a 37°C por uma semana. Alíquotas de veneno de cada sistema tampão foram coletadas nos tempos: zero hora (T0), 3 horas (T1), 6 horas (T2), 24 horas (T3), 48 horas (T4), 72 horas (T5) e uma semana (T6).

As amostras coletadas foram estocadas a -20°C para posteriores análises do perfil molecular, das atividades imunológicas e biológicas do veneno após indução

da autoproteólise sobre seus constituintes. Para as análises o veneno foi descongelado e aquecido a 37 °C.

3.5 Caracterização do perfil molecular do veneno de *B. atrox*

3.5.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS-PAGE

Para a obtenção do perfil eletroforético foi utilizada a técnica descrita por Laemmli (1970). No sistema eletroforético foi utilizado gel de concentração de 4% e gel de corrida a 15%. As amostras do veneno foram diluídas em tampão-amostra (Tris 0,125 M, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,05%) sob condições não redutoras e redutoras (adicionando-se ou não Ditionitrito – DTT).

Os géis de poliacrilamida foram submetidos à eletroforese vertical em solução tampão de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,5) com corrente elétrica constante de 20 mA por gel, a 10° C, por aproximadamente 2 horas, em seguida foram retirados e corados *overnight* com solução de 0,02% de *Coomassie Blue* R-250 e descorados com solução descorante (50% metanol, 10% ácido acético e 40% de água deionizada). Posteriormente, os géis foram registrados no *scanner ImageMaster 2D Platinum da Amersham Biosciences*.

Após a eletroforese, os géis também foram corados com solução de Nitrato de Prata (AgNO₃), e posteriormente, os géis foram fotodocumentados e analisados como anteriormente descrito.

3.5.2 Zimograma da atividade proteolítica

A atividade proteolítica do veneno sobre o fibrinogênio ou a gelatina foi determinada segundo procedimento descrito no item 3.5.1, acrescentando à solução do gel de corrida (antes da polimerização), fibrinogênio ou gelatina (10 mg/gel). As amostras do veneno foram diluídas em tampão-amostra sob condições não redutoras. As bandas com tonalidade branca que foram observadas sob o fundo azul do gel indicaram a atividade proteolítica do veneno.

3.5.3 Eletroforese Bidimensional

Primeira Dimensão: Focalização Isoelétrica

Na preparação das amostras dos venenos de *B. atrox* foi utilizado 1 mg do veneno diluído em tampão amostra (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, 100 µl de IPG Buffer, 10 µl de azul de bromofenol e 14 mg de DTT em volume final de 5 ml). Foram colocados 450 µl dessa solução em cada fita de 24 cm, com faixa de pH 3-11 NL e hidratadas por no mínimo 10 horas.

Para a focalização isoelétrica das toxinas protéicas do veneno, foi utilizado o sistema *Ettan IPGphor 3 da GE Healthcare*. A focalização ocorreu até que se atingisse um total de 40.000 volts/hora (Vh).

Após a eletrofocalização, as fitas foram equilibradas primeiramente em uma solução redutora com DTT (20 minutos) e posteriormente em uma solução de alquilação com iodo acetamida (20 minutos). Depois de equilibradas, foram colocadas no gel SDS-PAGE para a separação das toxinas por suas massas moleculares.

Segunda Dimensão: Eletroforese SDS-PAGE

O sistema SDS-PAGE foi preparado segundo item 3.5.1. A fita com as amostras focalizadas foi colocada na cuba de eletroforese e selada com agarose 1%. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com *Coomassie Blue R-250* 0,025%, descorados, escaneados e analisados no sistema *ImageMaster 2D Platinum 7.0 da GE Healthcare*.

3.5.4 Eletroforese Tris-Tricina – SDS-PAGE

Para obtenção do perfil eletroforético Tris-Tricina – SDS-PAGE foi usada técnica descrita por Schägger (2006). Foi preparado o gel separador com glicerol e as amostras em condições não-redutoras.

Para a preparação dos géis foram usadas as seguintes soluções: solução A (Tris-HCL 3 mol/l pH 8,45, contendo SDS 0,3%), solução B (48% acrilamida e 1,5% bisacrilamida) e solução C (46,5% acrilamida e 3% bisacrilamida).

Preparação do gel separador – com glicerol: 3,3 ml de solução A; 3,3 ml de solução C; 1,1 ml de glicerol; 2,3 ml de água destilada; 70 µl de PSA 10% e 7 µl de TEMED.

Preparação do gel espaçador: 2,5 ml de solução A; 1,5 ml de solução B; 3,5 ml de água destilada; 25 µl de PSA 10% e 3 µl de TEMED.

Preparação do gel concentrador: 0,80 ml de solução A; 0,25 ml de solução B; 2,10 ml de água destilada; 25 µl de PSA 10% e 3 µl de TEMED.

Ao montar-se a placa, colocou-se primeiro o gel separador (2,5 ml) e imediatamente após, colocou-se o gel espaçador (1,5 ml) para que os dois polimerizem juntos, evitando-se a formação de fase entre eles; cobriu-se com água destilada. Após a polimerização destes géis, adicionou-se o gel concentrador.

As amostras do veneno (40 µg/µl) foram dissolvidas no tampão amostra (Tris-HCl 0,05 mol/l pH 6,8 SDS 4% e azul de bromofenol 0,01%) e aplicadas nos géis; o processo eletroforético foi realizado em solução tampão Tris-HCl 0,2 mol/l pH 8,9 (tampão anódico) e tampão Tris 0,1 mol/l pH 8,25 contendo Tricina 0,1 mol/l e SDS 0,1% (tampão catódico).

Os géis foram corados com *Coomassie Blue R-250* 0,025% ou Nitrato de Prata (AgNO₃) e escaneados segundo o item 3.5.1.

3.6 Análise imunológica por Western blotting

A técnica foi procedida de acordo com a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979), com algumas modificações. As amostras foram previamente submetidas à eletroforese Tris-Tricina - SDS-PAGE. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas com solução de transferência (Tris 14 mM, Glicina 192 mM e 200

ml/l de metanol) para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente constante de 260 mA e 550 V e 100 W por 2:30 horas. A membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S (0,5%) para avaliar a eficiência da transferência das proteínas. Depois a membrana foi lavada, por 2 horas com TBS-T (Tris-salina 10 mM, NaCl 150 mM e *Tween* 20 0,05%) e leite Molico ® 5% para bloquear sítios inespecíficos de ligação. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos policlonais de cavalo ou de camundongo contra veneno de *B. atrox* diluídos na proporção de 1:1000 ou 1:200, respectivamente, em solução de TBS-T.

Após a incubação, as membranas de nitrocelulose foram lavadas quatro vezes com TBS-T e incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com anti-IgG total de cavalo ou camundongos, conjugados com peroxidase (SIGMA Co., USA), diluindo-se 1:2000 em TBS (Tris-salina 10 mM e NaCl 150 mM). Após quatro lavagens em TBS, a reação de detecção das bandas de proteína foi desenvolvida com adição do substrato para a peroxidase (1,5 mg 4- α -cloro-1-naphtol + 0,5 ml metanol + 17,5 ml TBS + 24 μ l H₂O₂).

3.7 Caracterização das atividades biológicas

3.7.1 Avaliação da Atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂)

A atividade da PLA₂ foi avaliada em placa de plástico contendo 1% de gel de agarose e 3% de gema de ovo (fonte de fosfolipídios) em tampão PBS (0,04 M), pH 8,1 (NaCl 0,12 M, CaCl₂ 0,09 M e azida de sódio 0,02%).

No gel foram feitos poços, com 3 mm de diâmetro, para serem aplicadas as amostras (autoproteolisadas ou não) do veneno de *B. atrox* diluídos em tampão PBS (0,04 M), pH 8,1.

As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida, por 24 horas. A avaliação da atividade da PLA₂ foi realizada com a análise estatística das médias e desvios padrão dos halos (mm); a atividade da PLA₂ foi expressa utilizando-se a fórmula:

$$\text{PERCENTAGEM DE ATIVIDADE PLA2} = \frac{\text{DIÂMETRO EXPERIMENTAL} \times 100}{\text{DIÂMETRO CONTROLE}}$$

3.7.2 Determinação da Atividade das Metaloproteinases (MPs) - Atividade gelatinase em meio sólido

A atividade gelatinase das MPs foi avaliada em placa de plástico, contendo 1% de gel de agarose e 1,5% de gelatina (fonte de colágeno) em tampão colagenase pH 7,5.

No gel foram feitos poços, com 3 mm de diâmetro, para serem aplicadas as amostras (autoproteolisadas ou não) do veneno de *B. atrox* (10 µg), diluídos em tampão colagenase pH 7,5.

As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida, por 24 horas. Após a incubação nas placas foi adicionado 5 ml de TCA (ácido tricloroacético 35%), segundo Medina & Baresi (2007), até que aparecesse um halo transparente (atividade gelatinase) sobre um fundo fosco. A análise estatística da atividade gelatinase foi realizada com as médias e desvios padrão dos halos (mm) e a atividade das MPs foi expressa utilizando-se a fórmula:

$$\text{PERCENTAGEM DE ATIVIDADE MPs} = \frac{\text{DIÂMETRO EXPERIMENTAL} \times 100}{\text{DIÂMETRO CONTROLE}}$$

3.7.3 Avaliação da Atividade coagulante

As amostras coletadas no intervalo de 0 hora a 1 semana de incubação a 37°C de veneno de *B. atrox*, foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%), resultando em uma proporção de 10 µg/50 µl. Posteriormente foram postas em banho-maria a 37°C por 5 minutos.

As amostras do veneno de *B. atrox* foram colocadas em tubos com (PBS 10 mM) pH 7,2, contendo 200 µl de fibrinogênio bovino (2 mg/ml) ou 200 µl de plasma humano. O tempo de início da coagulação induzido pelas toxinas do veneno foi

cronometrado. A atividade coagulante das amostras do veneno foi expressa utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ DE ATIVIDADE COAGULANTE} = 100 - \left(\frac{\text{T. DE INÍCIO DE COAGULAÇÃO EXPERIMENTAL} - \text{T. DE INÍCIO DE COAGULAÇÃO CONTROLE}}{\text{T. DE INÍCIO DE COAGULAÇÃO EXPERIMENTAL}} \times 100 \right)$$

3.7.4 Avaliação da atividade hemorrágica *in vivo*

Grupos de camundongos (*Mus musculus*) receberam na região abdominal, por via intradérmica (*i.d.*) amostras (autoproteolisadas ou não) de veneno de *B. atrox* (20 µg do veneno/100 µl de solução salina fisiológica). Após a inoculação do veneno, os animais ficaram sob observação durante 2 horas, posteriormente os animais foram anestesiados e sacrificados. A pele da região abdominal foi retirada e avaliada a intensidade e o diâmetro do halo (mm) hemorrágico. A análise estatística foi realizada com as médias e desvios padrão dos halos (mm) hemorrágicos obtidos e a atividade foi expressa utilizando-se a fórmula:

$$\text{PERCENTAGEM DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA} = \frac{\text{DIÂMETRO EXPERIMENTAL} \times 100}{\text{DIÂMETRO CONTROLE}}$$

3.7.5 Avaliação da Atividade Desfibrinogenante

Para avaliar o efeito desfibrinogenante foi empregado o método descrito por Theakston & Reid (1983). O veneno de *B. atrox* (10 µg) foi diluído em NaCl 0,9% (200 µl) e injetado via intravenosa (*i.v.*) em camundongos. Duas horas após a injeção, os animais foram anestesiados com éter e sangrados pelo plexo braquial direito. As amostras de sangue foram deixadas em tubos de hemólise, à temperatura ambiente, por duas horas. A incoagulabilidade sanguínea foi avaliada após esse período.

3.7.6 Avaliação da indução de Edema

Foi injetado em camundongos, veneno de *B. atrox* diluído em NaCl 0,9% (20 µg/ 100 µl) no coxim das patas direitas (pata experimental), e no coxim das patas

esquerdas (pata controle) foram inoculados somente 100 µl de NaCl 0,9%. Os animais ficaram em observação e o diâmetro dos edemas de suas patas foi medido com paquímetro digital (*Starret*) nos respectivos tempos: 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas. A atividade foi avaliada medindo o diâmetro do coxim da “pata controle” pela diferença do diâmetro do coxim da “pata experimental” e expresso em percentagem.

3.7.7 Avaliação da Letalidade do veneno autoproteolisado

A dose letal do veneno *in natura* de *B. atrox* foi determinada segundo a análise de próbitos, Finney (1971). Doses de veneno 3DL50% (300 µg) e 5DL50% (500 µg) dissolvidos em solução de NaCl 0,9% (0,5 ml) também foram inoculadas por via intraperitoneal (*i.p.*) em camundongos albinos (20 ± 2 g) com veneno autoproteolisado ou não-autoproteolisado. As mortes dos animais foram avaliadas em um período de 24 horas.

3.8 Imunização de animais experimentais - Produção de plasma hiperimune experimental

Grupos de camundongos foram imunizados, via subcutânea, com amostras do veneno de *B. atrox* (T0, T5 ou T6), recebendo com um intervalo de uma semana entre elas, as doses de 50 µg, 100 µg, 150 µg, e 200 µg, respectivamente. Após sete dias da última dose foi coletado o sangue, centrifugado e obtido o soro hiperimune e armazenado a 20 °C. Foram utilizados adjuvantes completo e incompleto de Freund ou Al(OH)₃.

3.9 Avaliação da Eficácia Neutralizante dos soros hiperimunes experimentais

3.9.1 Avaliação da Neutralização da Atividade Hemorrágica

A neutralização do efeito hemorrágico foi avaliada após a incubação por 30 minutos (37 °C) de veneno de *B. atrox* (10 µg) com diferentes concentrações (µl) de soro hiperimune experimental. Após a incubação, o soro com o veneno foram injetados via intradérmica (*i.d.*) no abdômen de camundongos. Após 2 horas, os

animais foram sacrificados, a pele removida e a área hemorrágica medida (GUTIERREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G.; 1987).

O resultado foi expresso como percentagem de hemorragia neutralizada, comparada com o grupo controle o qual recebeu apenas o veneno, segundo a fórmula:

$$\text{PERCENTAGEM DE ATIVIDADE NEUTRALIZANTE} = 100 - \left(\frac{\text{DIÂMETRO EXPERIMENTAL} \times 100}{\text{DIÂMETRO CONTROLE}} \right)$$

3.9.2 Avaliação da Neutralização da Atividade Fosfolipásica A₂

O veneno de *B. atrox* (10 µg) foi acrescentado a diferentes concentrações (µl) do soro hiperimune e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Logo em seguida foi adicionado ao de gel de agarose preparado segundo item 3.6.1. As placas foram incubadas (37°C) por 24 horas e o diâmetro dos halos medidos. A capacidade da neutralização foi expressa com a quantidade de soro que inibe a atividade fosfolipásica induzida pelo veneno utilizando-se a fórmula:

$$\text{PERCENTAGEM DE ATIVIDADE NEUTRALIZANTE} = 100 - \left(\frac{\text{DIÂMETRO EXPERIMENTAL} \times 100}{\text{DIÂMETRO CONTROLE}} \right)$$

3.9.3 Avaliação da Neutralização da Atividade Coagulante

As amostras do veneno de *B. atrox* foram colocadas em tubos com PBS, pH 7, 2, contendo fibrinogênio bovino (2 mg/ml) com diferentes concentrações (µl) de soro hiperimune experimental. O tempo de início da coagulação induzido pelas toxinas do veneno foi cronometrado. A neutralização da atividade coagulante das amostras do veneno foi expressa utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ DE ATIV. COAGULANTE} = 100 - \left(\frac{\text{T. DE INÍCIO DE COAGULAÇÃO EXPERIMENTAL} - \text{T. DE INÍCIO DE COAGULAÇÃO CONTROLE}}{\text{T. DE INÍCIO DE COAGULAÇÃO EXPERIMENTAL}} \times 100 \right)$$

3.9.4 Avaliação da Neutralização da Atividade Desfibrinogenante

Para avaliar a neutralização do efeito desfibrinogenante, foi empregado o método descrito por Theakston & Reid (1983). Foi injetado em camundongos, por via intravenosa (*i.v.*), o veneno de *B.atrox* (10 µg) em diferentes proporções de soro (1:1, 1:2 e 1:3 respectivamente), diluídos em 200 µl de NaCl 0,9% previamente incubados a 37°C por 30 minutos. Uma hora após a injeção, os animais foram anestesiados com éter e sangrados pelo plexo braquial. As amostras de sangue foram deixadas em tudo de hemólise, à temperatura ambiente, por duas horas. A capacidade de incoagulabilidade sanguínea foi analisada após esse período.

3.9.5 Avaliação Preliminar da Neutralização *in vivo* da Letalidade do Veneno de *B. atrox* pelos soros hiperimunes experimentais

A letalidade do veneno de *B. atrox* foi determinada inoculando-se doses de veneno 3DL50% (15 mg/kg) e 5DL50% (25 mg/kg) dissolvidos em solução de NaCl 0,9% (0,5 ml) por via intraperitoneal (*i.p.*) em camundongos albinos (20 ± 2 g) imunizados com veneno autoproteolisado (T6) ou não-autoproteolisado (T0). A neutralização foi reportada com o número de animais mortos/número de animais vivos após 24 horas.

O processo de imunização, usando-se as amostras do veneno de *B. atrox* T0 e T6 foi segundo o item 3.8, usando-se como adjuvantes; adjuvante de Freund (completo e incompleto) e Al(OH)₃.

4.0 RESULTADOS

4.1 Caracterização do Perfil Molecular do veneno de *B. atrox*

4.1.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS-PAGE

4.1.1.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM) pH 7,2

As análises dos perfis moleculares por SDS-PAGE (Figura 10-a) mostraram que, após autoproteólise do veneno de *B. atrox* em tampão PBS, pH 7,2 por uma semana, houve degradação das proteínas de 50, 23 e 14 kDa, o surgimento de proteínas com aproximadamente 30 kDa e um número maior de proteínas de 14 kDa. Observa-se que quanto maior o tempo de incubação, a proteína de 50 kDa é mais degradada.

A eletroforese Tris-Tricina com glicerol (Figura 10-b), em condições não redutoras, possibilitou uma melhor visualização de proteínas de baixa massa molecular (menores que 14 kDa) e melhor resolução de proteínas na faixa de 30 e 23 kDa.

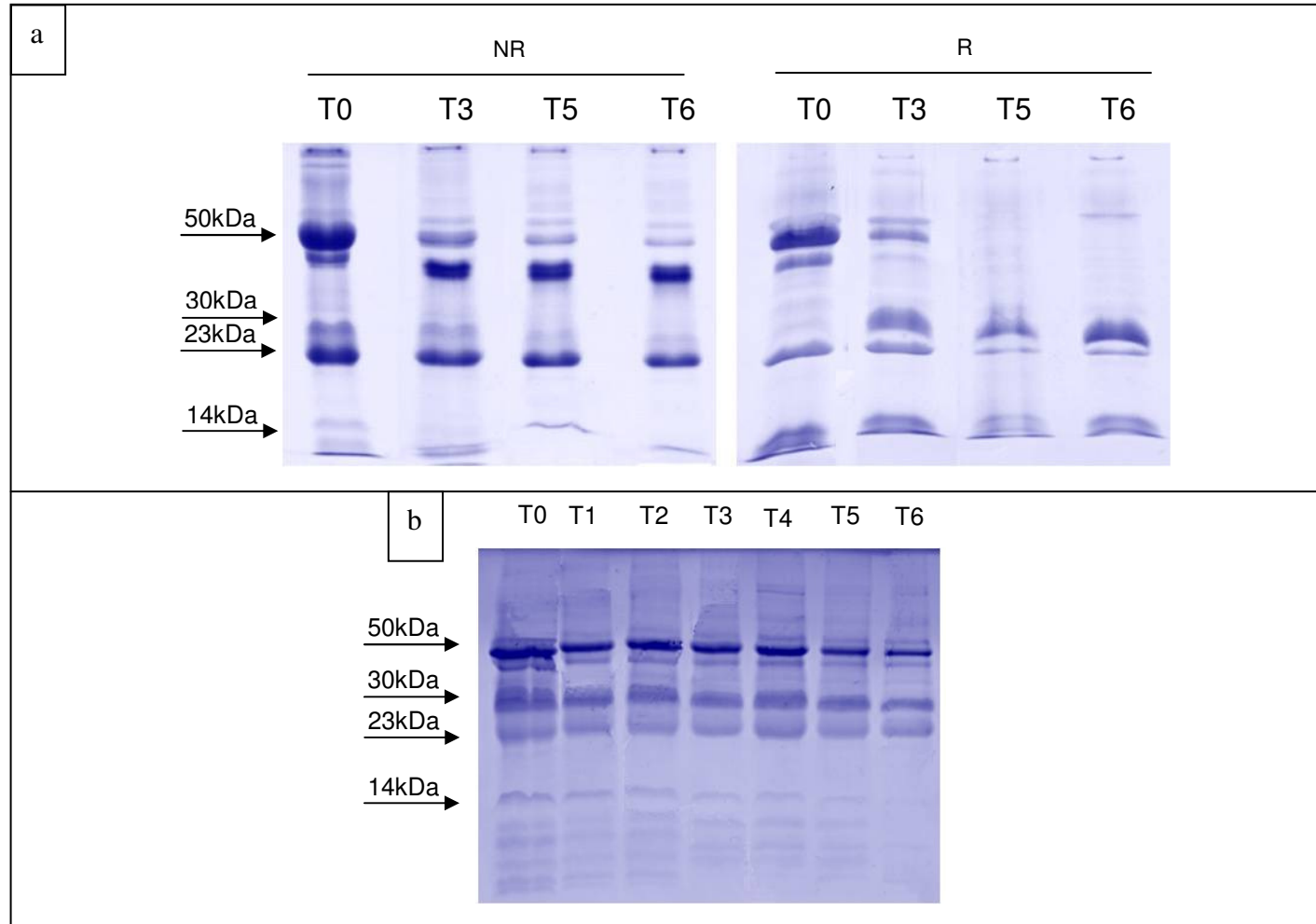


Figura 10 – Perfis eletroforéticos após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (40 µg) de *B. atrox* em tampão PBS (100 mM) pH 7,2: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). (a) SDS-PAGE em condições não reduzidas (NR) e reduzidas (R), géis (15%) corados com *Coomassie Blue R-250*. (b) Tris-Tricina com glicerol – SDS-PAGE em condições não reduzidas, corado com *Coomassie Blue R-250*. MM: marcadores de massa molecular do veneno de *B. atrox* (López-Lozano, 2002).

4.1.1.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

A análise dos perfis SDS-PAGE (Figura 11-a) mostrou que, após autoproteólise do veneno de *B. atrox* em tampão COLAGENASE durante uma semana, houve uma degradação das proteínas de 50, 23 e 14 kDa e o surgimento de proteína de aproximadamente 30 kDa. Perfil molecular similar ao detectado após autoproteólise em tampão PBS, porém a proteína de 50 kDa ainda é detectada após uma semana de incubação.

A eletroforese Tris-Tricina com glicerol (Figura 11-b), em condições não redutoras, possibilitou uma melhor visualização de proteínas com massa molecular inferior a 14 kDa.

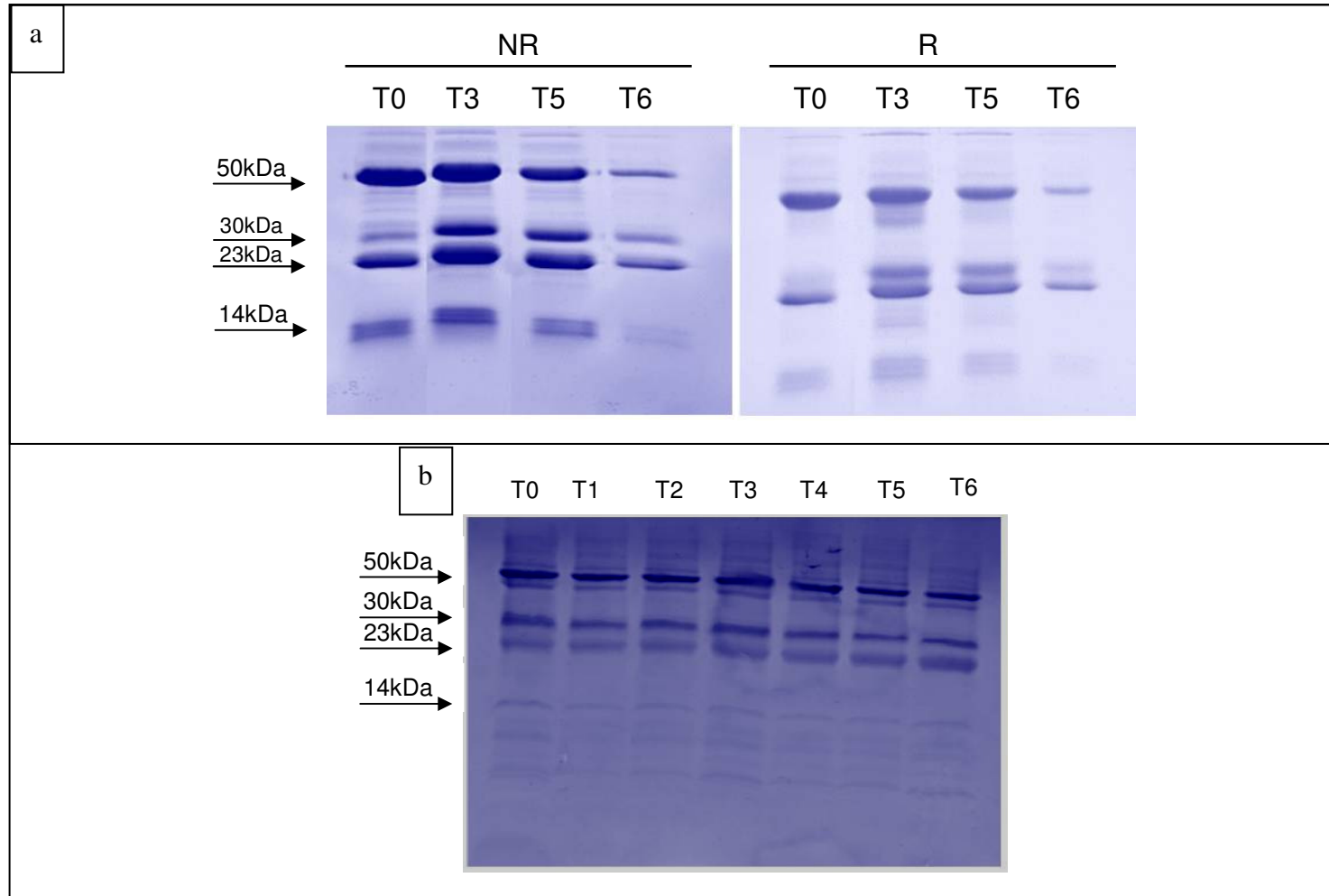


Figura 11– Perfis eletroforéticos após diferentes tempos de incubação a 37 °C das amostras do veneno (40 µg) de *B. atrox* em tampão COLAGENASE (Tris 50 mM) pH 7,5: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). (a) SDS-PAGE em condições não reduzidas (NR) e reduzidas (R), géis (15%) corados com *Coomassie Blue R-250*. (b) Tris-Tricina com glicerol – SDS-PAGE em condições não reduzidas, corado com *Coomassie Blue R-250*. MM: marcadores de massa molecular do veneno de *B. atrox* (López-Lozano, 2002).

4.1.2 Eletroforese Bidimensional

4.1.2.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

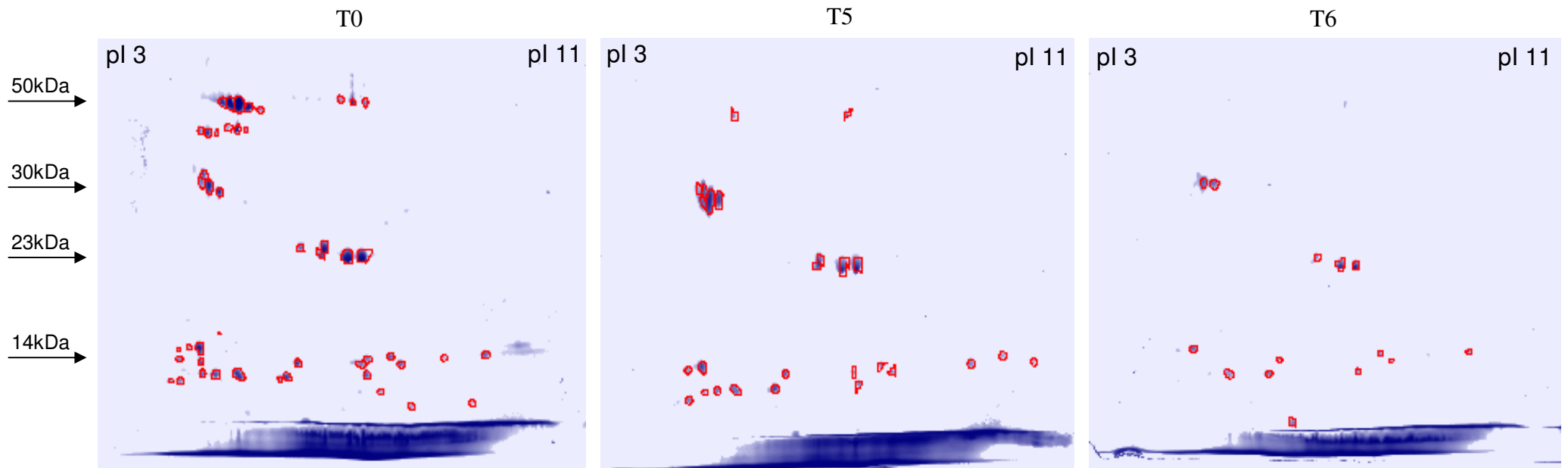


Figura 12 – Perfil eletroforético Bidimensional após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (500 µg) de *B. atrox* em tampão PBS: T0 (zero hora), T5 (72 horas) e T6 (168 horas). *Strip* pH 3-11 NL (24 cm). Géis corados com *Coomassie Blue R-250*.

Após autoproteólise em tampão PBS, pH 7,2 foi detectado que: no veneno de *B. atrox* T0 (Figura 12-T0) foram detectadas 47 proteínas com massas moleculares de 14 a 50 kDa aproximadamente, as quais 33 apresentaram o pI 4 a 6 e 14 com pI 7 a 9.

No veneno de *B. atrox* T5 (Figura 12-T5) foram detectadas 25 proteínas com massas moleculares de 14 a 50 kDa aproximadamente; 15 delas apresentaram pI 4 a 6 e 10 com pI 7 a 10.

No veneno de *B. atrox* T6 (Figura 12-T6) foram detectadas 14 proteínas com massas moleculares de 10 a 30 kDa aproximadamente; 8 delas apresentaram pI 4 a 6 e 6 com pI 7 a 10.

Os perfis eletroforéticos bidimensionais obtidos confirmam os perfis obtidos nas eletroforeses SDS-PAGE (Figura 10). Observou-se que houve uma gradativa degradação das proteínas de 30, 23 e 14 kDa do veneno de *B. atrox* após uma semana de autoproteólise. As proteínas de 50 kDa não foram detectadas após uma semana de autoproteólise. Também foi observada a diminuição da quantidade total de proteínas durante a semana de autoproteólise.

4.1.2.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

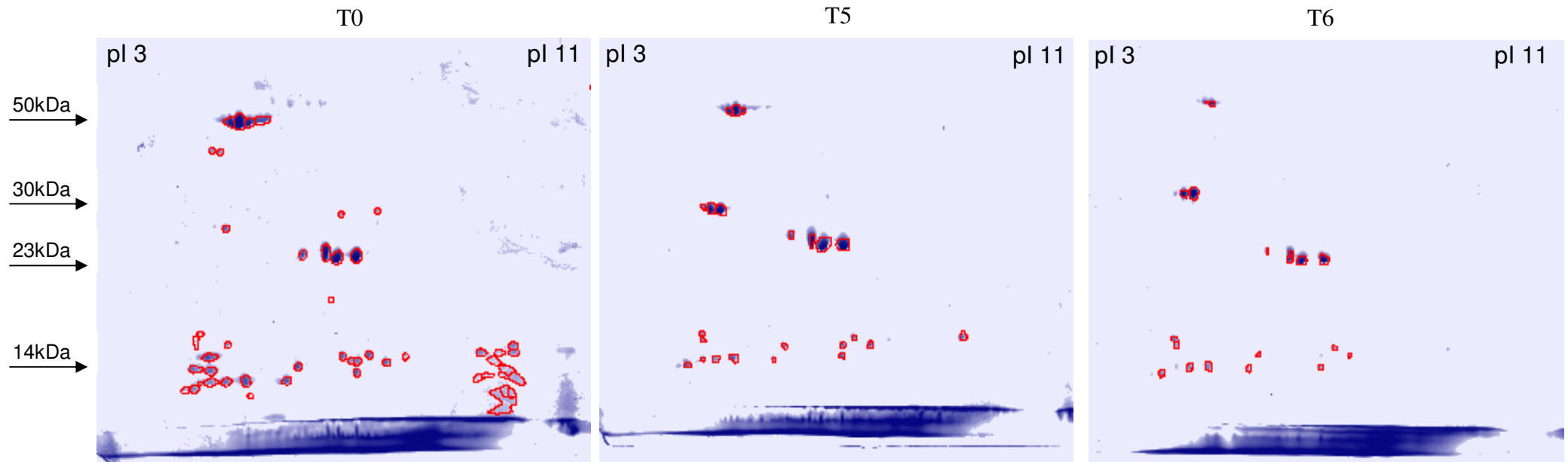


Figura 13 – Perfil eletroforético Bidimensional após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (500 µg) de *B. atrox* em tampão COLAGENASE: T0 (zero hora), T5 (72 horas) e T6 (168 horas). *Strip* pH 3-11 NL (24 cm). Géis corados com *Coomassie Blue R-250*.

Após autoproteólise em tampão COLAGENASE, pH 7,5 foi detectado que: no veneno de *B. atrox* T0 (Figura 13-T0) foram detectadas 49 proteínas com massas moleculares de 14 a 50 kDa aproximadamente; 27 apresentaram pI 4 a 6 e 22 com pI 7 a 10.

No veneno de *B. atrox* T5 (Figura 13-T5) foram detectadas 23 proteínas com massas moleculares de 14 a 50 kDa aproximadamente; 20 delas apresentaram pI 4 a 6 e 3 com pI 7 a 9.

No veneno de *B. atrox* T6 (Figura 13-T6) foram detectadas 18 proteínas com massas moleculares de 23 a 50 kDa aproximadamente; 16 delas apresentaram pI 4 a 6 e 2 com pI 7.

Os perfis eletroforéticos bidimensionais obtidos confirmam os perfis obtidos nas eletroforeses SDS-PAGE (Figura 11). Observou-se que houve uma gradativa degradação das proteínas de 50, 23 e 14 kDa do veneno de *B. atrox* após uma semana de autoproteólise e o surgimento de proteína de 30 kDa, porém diferem-se dos perfis eletroforéticos bidimensionais dos venenos de *B. atrox* autoproteolisados com tampão PBS, pois as proteínas de 50 kDa permanecem após uma semana de autoproteólise e as proteínas de 30 e 23 kDa foram detectadas em maior intensidade após uma semana quando comparadas com as proteínas similares após autoproteólise em PBS.

4.2 Caracterização das atividades biológicas

4.2.1 Avaliação da Atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂)

A Atividade Fosfolipásica A₂ do veneno autoproteolizado de *B. atrox* após uma semana em tampão PBS diminuiu gradativamente chegando a 56,6% (Figura 14, Tabela 02, Gráfico 02).

A Atividade Fosfolipásica A₂ do veneno autoproteolizado de *B. atrox* por uma semana em tampão COLAGENASE diminuiu gradativamente chegando a 43,8% (Figura 15, Tabela 03, Gráfico 03).

O veneno autoproteolizado de *B. atrox* por uma semana tanto em tampão COLAGENASE quanto em PBS teve suas atividades gradativamente diminuídas após uma semana de autoproteólise, embora houvesse maior perda dessa atividade quando o veneno foi incubado em tampão COLAGENASE.

4.2.1.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

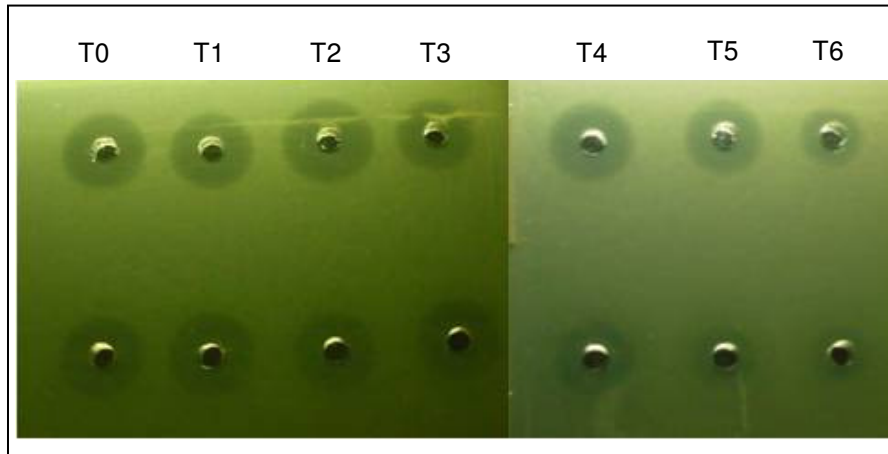


Figura 14- Atividade Fosfolipásica A_2 após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (10 μg) de *B. atrox* com tampão PBS: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: T0.

Tabela 02 – Atividade Fosfolipásica A_2 (PLA_2) do veneno incubado de *B. atrox* por uma semana a 37°C em tampão PBS.

Tempo de incubação das amostras	Média (halo/ mm^2)	% Atividade PLA_2
T0*	11,7 \pm 0,6	100
T1	11,4 \pm 0	97,6
T2	11,5 \pm 3,1	98,4
T3	10,4 \pm 0,9	88,9
T4	9,6 \pm 0	82,3
T5	8,0 \pm 2,0	68,8
T6	6,6 \pm 0,1	56,6

*Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0). Em todas as amostras foi utilizado 10 μg do veneno

4.2.1.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

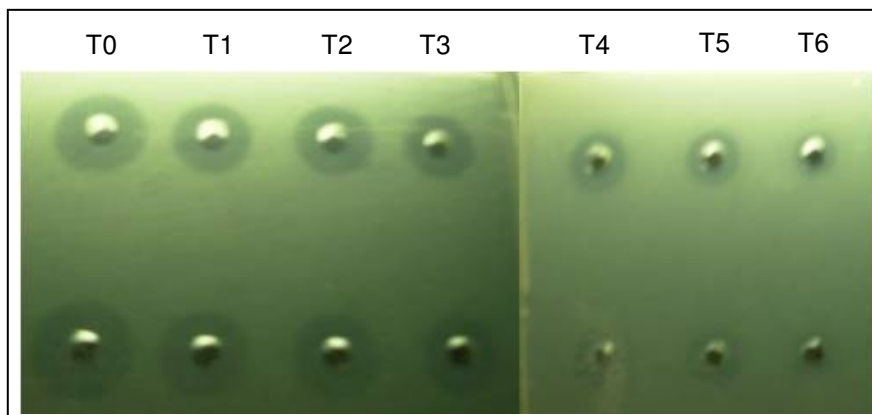


Figura 15- Atividade Fosfolipásica A₂ após diferentes tempos de incubação a 37 °C das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* com tampão COLAGENASE: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: T0.

Tabela 03 – Atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂) do veneno incubado de *B. atrox* por uma semana a 37°C em tampão COLAGENASE.

Tempo de incubação das amostras	Média (halo/mm ²)	% Atividade PLA ₂
T0*	11,7 ± 0,8	100
T1	11,2 ± 0,7	96,4
T2	11,1 ± 0,3	95,5
T3	10,6 ± 0,3	90,8
T4	8,5 ± 0	73,2
T5	7,2 ± 0,2	61,7
T6	5,1 ± 0,4	43,8

*Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0). Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno

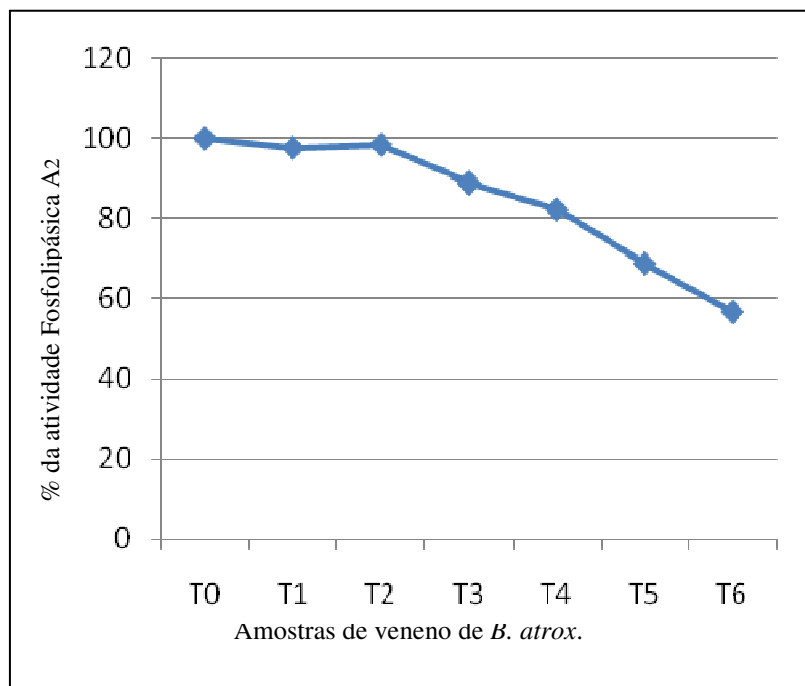


Gráfico 02 – Cinética da atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂) do veneno autoproteolizado de *B. atrox* segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: T0.

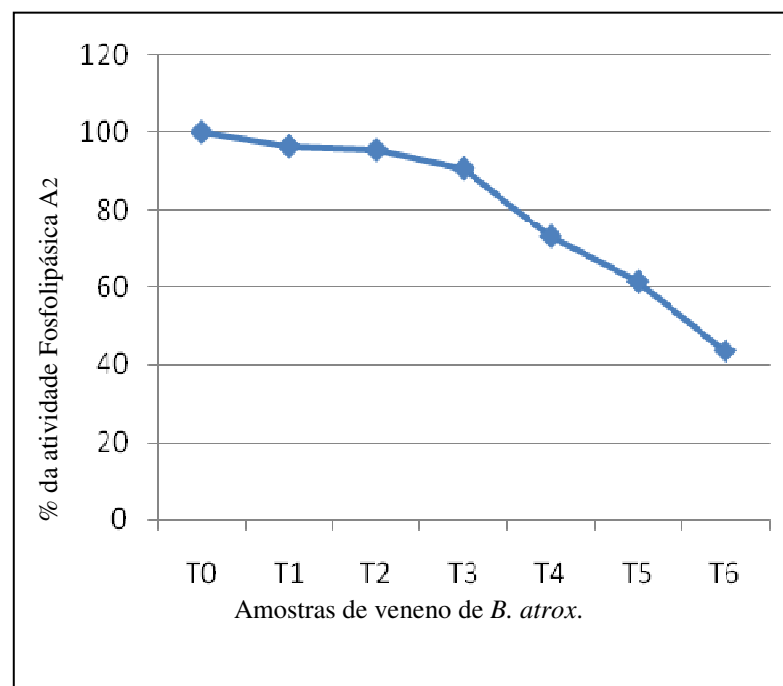


Gráfico 03 – Cinética da atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂) do veneno autoproteolizado de *B. atrox* segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: T0.

4.2.2 Zimograma da Atividade Proteolítica

Os zimogramas do veneno de *B. atrox* autoproteolisados com tampão PBS e COLAGENASE revelaram atividades proteolíticas sobre a gelatina (Figura 12), referentes às bandas protéicas de aproximadamente 50 e 23 kDa, e sobre o fibrinogênio bovino (Figura 16), referente à banda protéica de aproximadamente 30 kDa durante uma semana de autoproteólise (T0, T5 e T6), porém a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e a gelatina do veneno autoproteolisado com tampão COLAGENASE apresenta bandas protéicas mais intensas que as amostras do veneno autoproteolisado em PBS.

As análises dos zimogramas sugerem que existe atividade proteolítica residual após uma semana de autoproteólise tanto sobre gelatina como sobre fibrinogênio bovino.

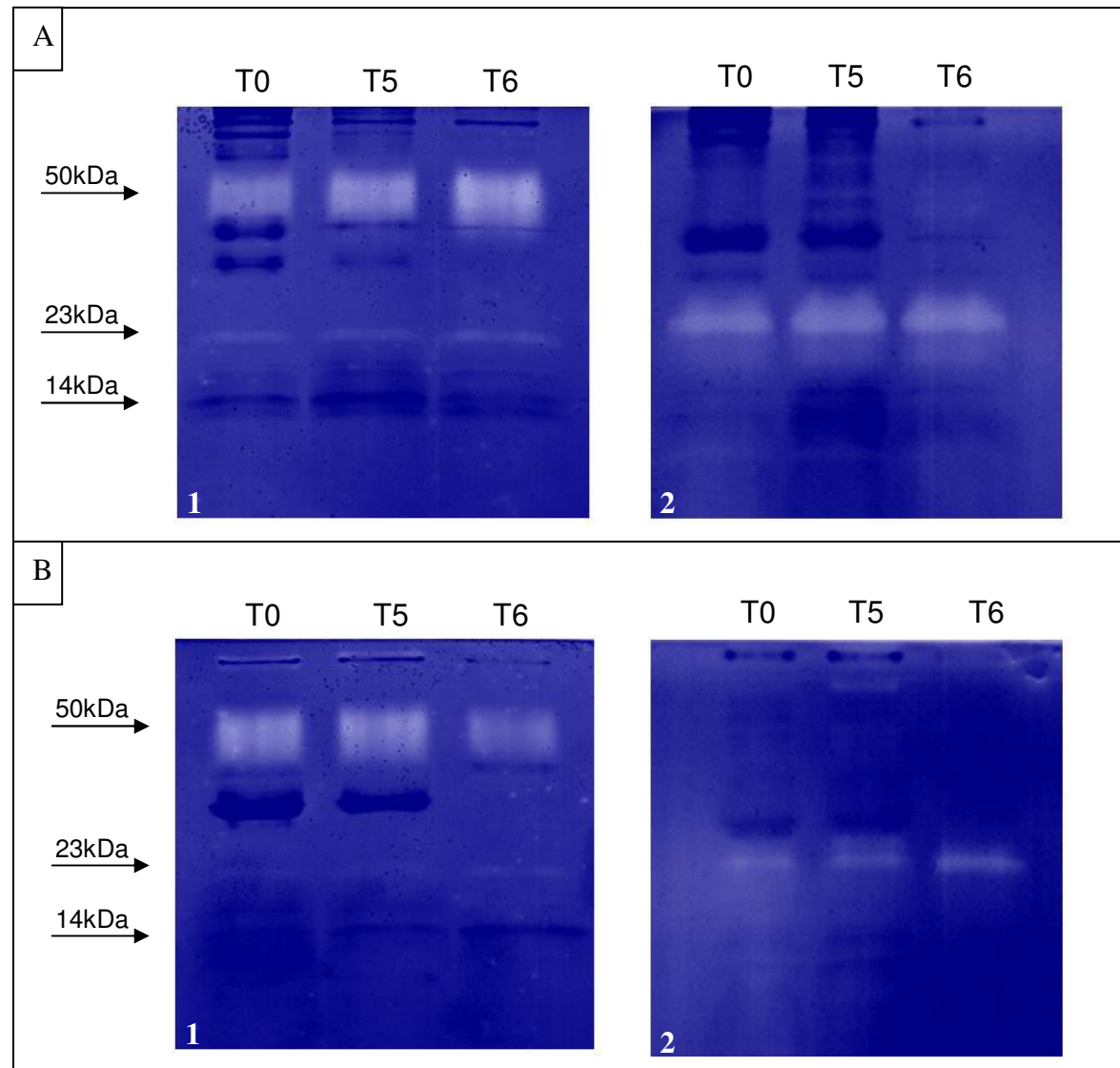


Figura 16 – Zimograma da atividade proteolítica após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (40 µg) de *B. atrox* nos tampões COLAGENASE (A) e PBS (B), em condições não reduzidas: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h). (1) Atividade gelatinase em tampão colagenase, pH 7,5. (2) Atividade fibrinogenolítica em tampão glicina, 100 mM, pH 8,3. Géis (15%) corados com *Coomassie Blue R-250*. MM: marcadores de massa molecular do veneno de *B. atrox* (López-Lozano, 2002).

4.2.3 Determinação da Atividade das Metaloproteinasas (MPs) - Atividade Gelatinase

Nas primeiras 6 h, a atividade gelatinase das MPs aumenta 25,9% quando o veneno foi incubado em tampão PBS, e depois há um decréscimo contínuo, diminuindo 100% a atividade das metaloproteinasas em um período de uma semana (Figura 17, Tabela 04, Gráfico 04).

Após uma semana de autoproteólise do veneno de *B. atrox*, quando incubado em tampão COLAGENASE, diminui 30% da atividade das suas metaloproteinasas (Figura 18, Tabela 05, Gráfico 05), e não foi detectado o aumento da atividade gelatinase.

A atividade gelatinase em todas as amostras do veneno foi inibida pelo EDTA, inibidor de metaloproteinasas pela quelação do zinco (dados não mostrados).

A atividade das metaloproteinasas do veneno autoproteolizado de *B. atrox* por uma semana tanto em tampão PBS quanto em COLAGENASE tem sua atividade gradativamente diminuída após uma semana de autoproteólise, porém o veneno autoproteolizado de *B. atrox* por uma semana em tampão PBS perde segundo método utilizado, totalmente a atividade das metaloproteinasas, enquanto o veneno autoproteolizado em COLAGENASE perde parcialmente a atividade após uma semana de autoproteólise.

Esses resultados confirmam os zimogramas (substrato gelatinase) do veneno de *B. atrox* autoproteolizado com tampão PBS e COLAGENASE que revelam atividade proteolítica sobre a gelatina (Figura 16).

4.2.3.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

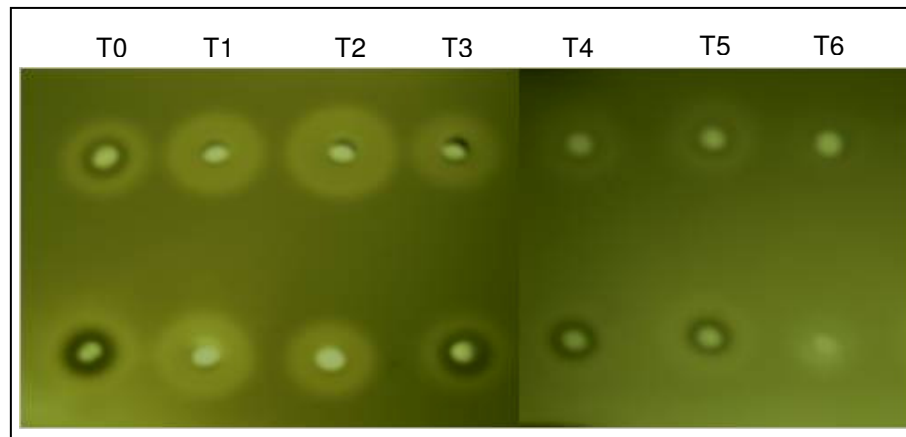


Figura 17- Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina após diferentes tempos de incubação a 37 °C das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* com tampão PBS T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: T0.

Tabela 04– Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina do veneno de *B. atrox*, segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.

Tempo de incubação das amostras	Média (halo/mm ²)	% Atividade MPs
T0*	10,7 ± 0,3	100
T1	12,5 ± 0,3	117,4
T2	13,4 ± 0,3	125,9
T3	10,6 ± 0,5	99,4
T4	8,6 ± 0,3	81,1
T5	8,6 ± 0,4	77,6
T6	0	0

*Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0). Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno

4.2.3.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

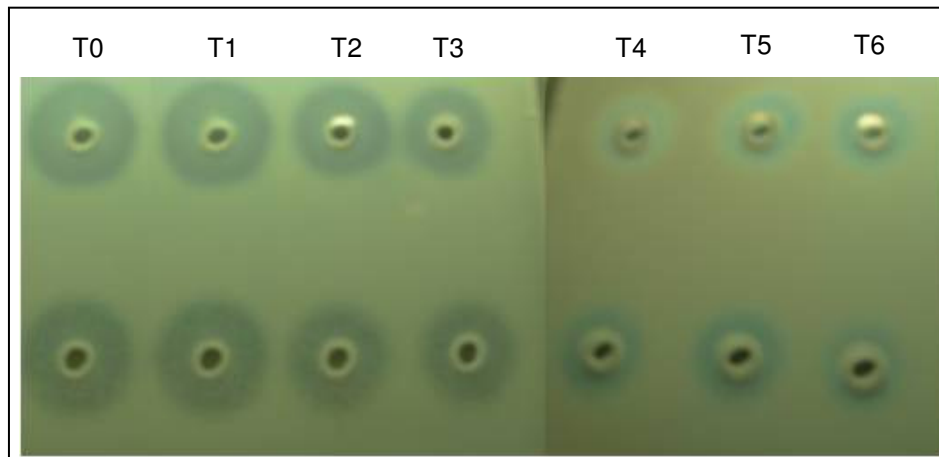


Figura 18- Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina após diferentes tempos de incubação a 37 °C das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* com tampão COLAGENASE T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: T0.

Tabela 05– Atividade das metaloproteinases sobre a gelatina do veneno de *B. atrox*, segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.

Tempo de incubação das amostras	Média (halo/mm ²)	% Atividade MPs
T0*	15,3 ± 0,6	100
T1	15,5 ± 0,3	101,6
T2	15,0 ± 0,4	98,3
T3	14,6 ± 0	95,9
T4	12,0 ± 0	78,5
T5	11,7 ± 0,2	76,8
T6	10,9 ± 0,9	71,4

*Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0). Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno

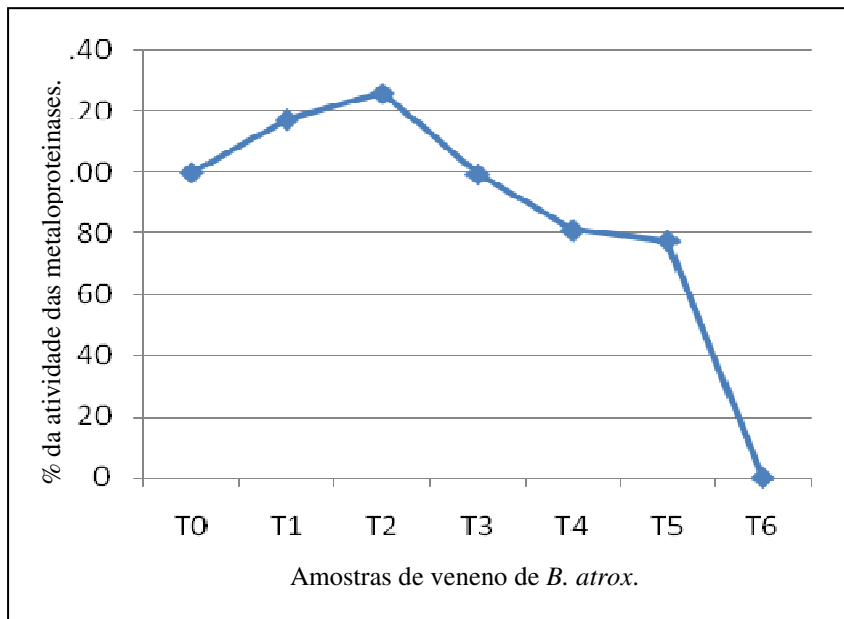


Gráfico 04– Atividade das metaloproteínases sobre a gelatina do veneno autoproteolísado de *B. atrox* segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.

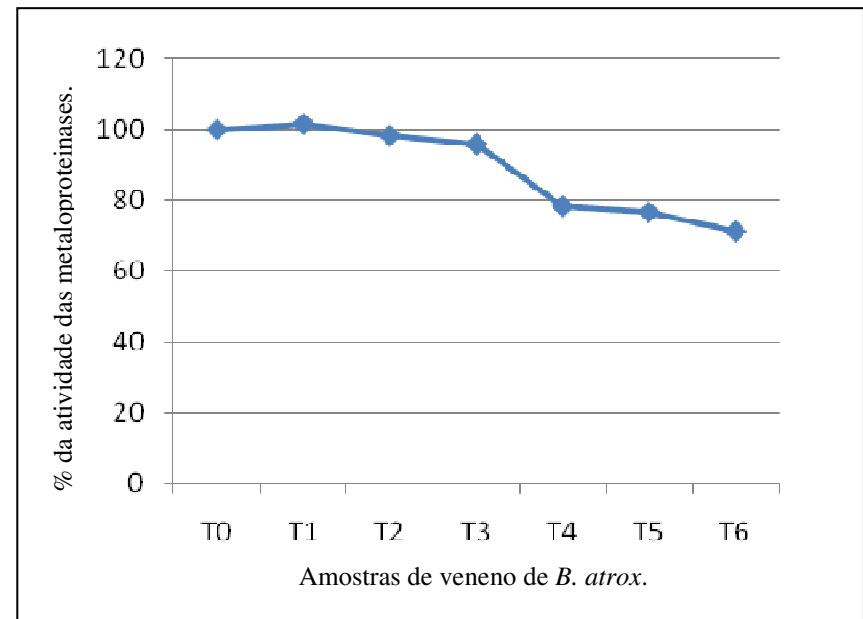


Gráfico 05– Atividade das metaloproteínases sobre a gelatina do veneno autoproteolísado de *B. atrox* segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.

4.2.4 Avaliação da atividade hemorrágica *in vivo*

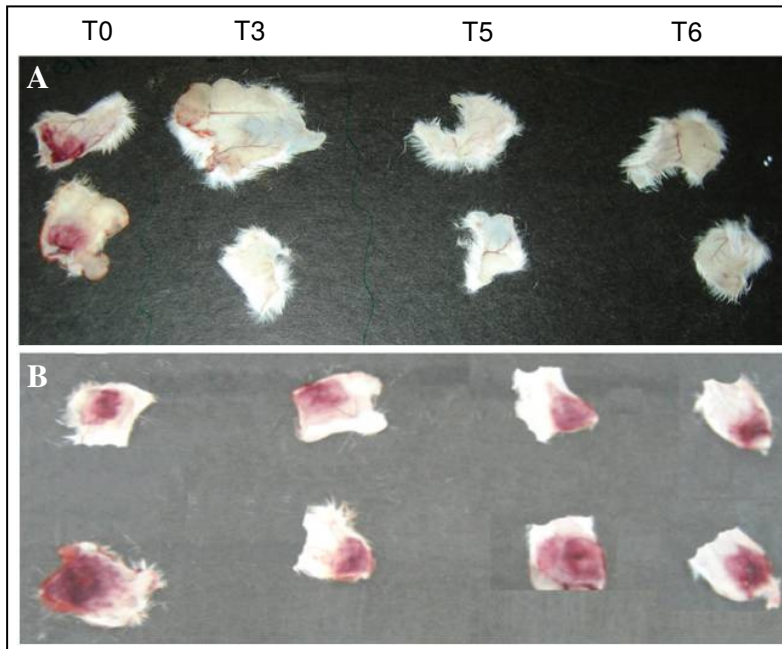


Figura 19- Atividade hemorrágica após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* após autoproteólise em tampão PBS (A) e COLAGENASE (B): T0 (zero h), T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (1 semana). Controle: veneno tempo zero (T0).

Tabela 06– Atividade hemorrágica segundo o tempo de incubação do veneno autoproteolisado de *B. atrox* segundo o tampão utilizado.

Tempo de incubação das amostras	TAMPÃO PBS			TAMPÃO COLAGENASE		
	Média (halo/mm ²)	% Atividade hemorrágica	Intensidade Hemorrágica	Média (halo/mm ²)	% Atividade hemorrágica	Intensidade Hemorrágica
T0*	0,5 ± 0	100	++++	0,7 ± 0	100	++++
T3	0,2 ± 0,2	40	+	0,6 ± 0	85,7	++++
T5	0	0	-	0,8 ± 0,2	114,2	++++
T6	0	0	-	0,5 ± 0	78,5	++++

* Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0). Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno.

A atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox* diminui de acordo com o tempo de autoproteólise do veneno em tampão PBS (Figura 19). Após 24 horas de autoproteólise (T3), não foi observada atividade hemorrágica, embora o zimograma com substrato gelatinase (Figura 12) e a atividade das metaloproteinases (Figura 17, Tabela 04) do veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão PBS revelaram atividade proteolítica sobre a gelatina mas com perda total dessa atividade após uma semana de autoproteólise.

As amostras do veneno após uma semana de autoproteólise de *B. atrox* apresentou atividade hemorrágica intensa após uma semana de autoproteólise em tampão COLAGENASE (Figura 19).

O zimograma com substrato gelatinase (Figura 16) e a atividade das metaloproteinases (Figura 18, Tabela 05) do veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão COLAGENASE revelaram atividade proteolítica sobre a gelatina com 70% de atividade gelatinase detectada após uma semana de autoproteólise

A atividade hemorrágica do veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão COLAGENASE é mais potente e permanece após uma semana de autoproteólise quando comparada ao do veneno autoproteolisado com tampão PBS que não é mais detectada no mesmo período (Tabela 06), sugerindo um efeito diferencial dos constituintes dos tampões usados sobre a estrutura/atividade dos fatores do veneno que induzem hemorragia e atividade gelatinase.

Isso pode ser confirmado por eletroforese uni e bidimensional (Figuras 11 e 13), onde as metaloproteinases de 50 kDa ainda estão presentes após uma semana de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE mas não no tampão PBS, já que a metaloproteinase de 50 kDa é degradada. Isto sugere que quantitativamente, após o processo de autoproteólise existe mais metaloproteinases hemorrágicas de 50 kDa nas amostras em tampão COLAGENASE.

4.2.5 Avaliação da Atividade Coagulante

4.2.5.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

A atividade coagulante do veneno de *B. atrox* sobre o fibrinogênio e o plasma humano permaneceu ativa no veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão PBS por até uma semana (Tabela 07), embora com a diminuição desta atividade durante o tempo de incubação do veneno.

O zimograma da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino do veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão PBS (Figura 16) confirma o resultado obtido na atividade Coagulante.

Tabela 07 – Atividade coagulante do veneno de *B. atrox*, segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS

Tempo de incubação das amostras	Plasma		Fibrinogênio	
	Tempo de início da coagulação (s)	% Atividade Coagulante	Tempo de início da coagulação (s)	% Atividade Coagulante
T0*	1,9 ± 0	100	49,3 ± 2,5	100
T5	2,6 ± 0,1	74,0	66,6 ± 4,9	74
T6	3,0 ± 0,1	63,7	112,3 ± 3,5	59,3

* Controle: veneno de *B. atrox* (10 µg) tempo zero (T0). Fibrinogênio (2 mg/ml). Plasma (200 µl). Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno.

4.2.5.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

O veneno autoproteolisado de *B. atrox* por uma semana em tampão COLAGENASE apresentou atividade coagulante sobre o fibrinogênio e o plasma, por até uma semana, ou seja, permaneceu ativo para essa atividade mesmo sobre autoproteólise embora de forma decrescente (Tabela 08).

O zimograma (substrato fibrinogênio) do veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão COLAGENASE e que revelam atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (Figura 16) confirma o resultado obtido na atividade coagulante.

Tabela 08 – Atividade coagulante do veneno de *B. atrox*, segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE.

Tempo de incubação das amostras	Plasma		Fibrinogênio	
	Tempo de início da coagulação (s)	% Atividade Coagulante	Tempo de início da coagulação (s)	% Atividade Coagulante
T0*	12,6 ± 0,8	100	1,4 ± 0	100
T5	28,7 ± 1,1	44,0	2,6 ± 0,5	54,0
T6	35,1 ± 1,2	36,1	5,1 ± 0,1	28,2

* Controle: veneno de *B. atrox* (10 µg) tempo zero (T0). Fibrinogênio (2 mg/ml). Plasma (200 µl). Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno.

A atividade coagulante sobre o fibrinogênio e o plasma do veneno autoproteolisado de *B. atrox* por uma semana em tampão PBS e COLAGENASE permaneceu ativo para essa atividade mesmo sobre autoproteólise, mas essas atividades residuais (%) foram maiores quando o veneno foi incubado em tampão PBS, possivelmente pela maior atividade proteolítica do veneno sobre as toxinas que induzem coagulação do fibrinogênio e do plasma.

4.2.6 Avaliação da Atividade Desfibrinogenante

4.2.6.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

Duas horas após a injeção via intravenosa (*i.v.*) em camundongos das amostras do veneno de *B. atrox* (10 µg) não incubada T0 (zero h) ou incubadas T5 (72 h) e T6 (168 h), diluídas em NaCl 0,9% (200 µl), os animais foram anestesiados com éter e sangrados pelo plexo braquial. As amostras de sangue foram deixadas em tubos de hemólise, à temperatura ambiente. Após 60 minutos a incoagulabilidade sanguínea foi detectada na amostra de sangue com veneno autoproteolisado de *B. atrox* T0, possuindo, portanto, atividade desfibrinogenante. As amostras de sangue com veneno autoproteolisado T5 coagularam parcialmente e as amostras de sangue

com veneno autoproteolizado T6 coagularam, sugerindo perda da atividade desfibrinogenante do veneno de *B. atrox* após o tempo de incubação utilizado.

4.2.7 Avaliação da indução de Edema

4.2.7.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2



Figura 20– Edema no coxim da pata de camundongos após tres horas de injeção das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* após incubação a 37°C em tampão PBS: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h).

Tabela 09– Atividade edematogênica do veneno de *B. atrox*, segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão PBS.

Tempo (horas)	T0*		T5		T6	
	Δ Edema (mm)	% Atividade edematogênica	Δ Edema (mm)	% Atividade edematogênica	Δ Edema (mm)	% Atividade edematogênica
1*	1,37	100	0,78	56,7	0,45	33,2
3	0,97	71,1	0,54	39,3	0,4	29,1
6	0,53	38,5	0,47	34,7	0,37	27,1
12	0,36	26,2	0,26	18,9	0,34	24,7
24	0,23	16,9	0,21	15,2	0,15	11,4

* Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0) uma hora após a injeção do veneno. Em todas as amostras foi utilizado 10 µg do veneno.

A atividade edematogênica do veneno autoproteolizado de *B. atrox* após a incubação a 37°C por uma semana em tampão PBS diminuiu de acordo com o tempo de autoproteólise do veneno (Figura 20, Tabela 09, Gráfico 06).

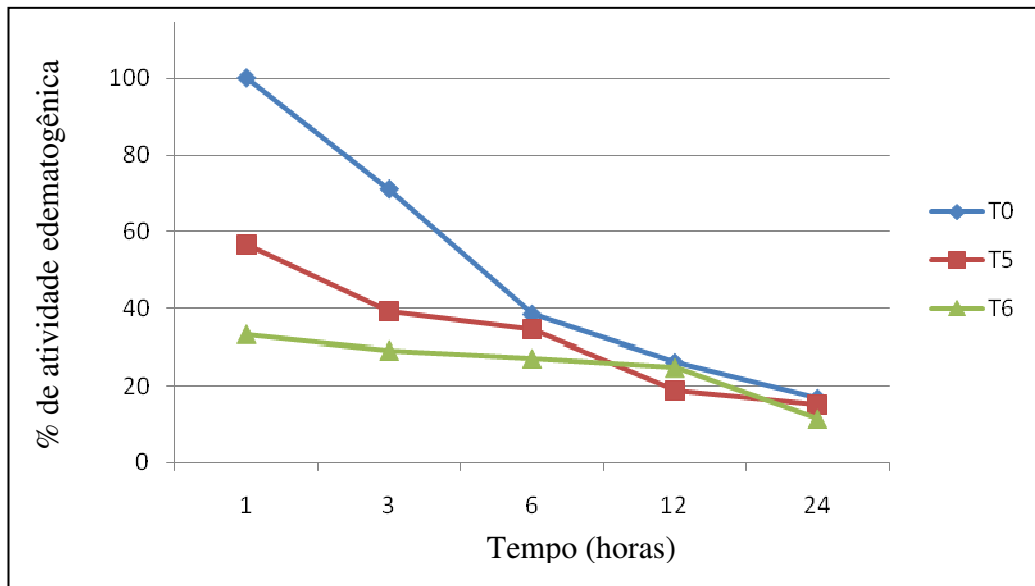


Gráfico 06– Atividade edematogênica do veneno (10 µg) autoproteolizado a 37°C de *B. atrox* por uma semana em tampão PBS: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h).

4.2.7.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5



Figura 21 – Edema no coxim da pata de camundongos após tres horas de injeção das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* após autoproteólise a 37°C em tampão COLAGENASE: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h).

Tabela 10– Atividade edematogênica do veneno de *B. atrox*, segundo o tempo de incubação a 37°C em tampão COLAGENASE

Tempo (horas)	T0*		T5		T6	
	Δ Edema (mm)	% Atividade edematogênica	Δ Edema (mm)	% Atividade edematogênica	Δ Edema (mm)	% Atividade edematogênica
1	2,21	100	2,1	95,3	1,14	51,7
3	2,6	118,5	2,83	128,2	1,79	81,14
6	2,6	117,7	2,11	95,6	1,96	88,8
12	2,09	94,7	1,95	88,3	1,99	90,0
24	1,56	70,5	1,55	70,2	1,81	82,0

* Controle: veneno de *B. atrox* tempo zero (T0).

Após uma semana de autoproteólise a 37°C o veneno de *B. atrox* apresentou atividade edematogênica intensa (Figura 21, Tabela 10, Gráfico 07). Foi observado extravasamento de fluidos, plasma e/ou líquidos intersticiais.

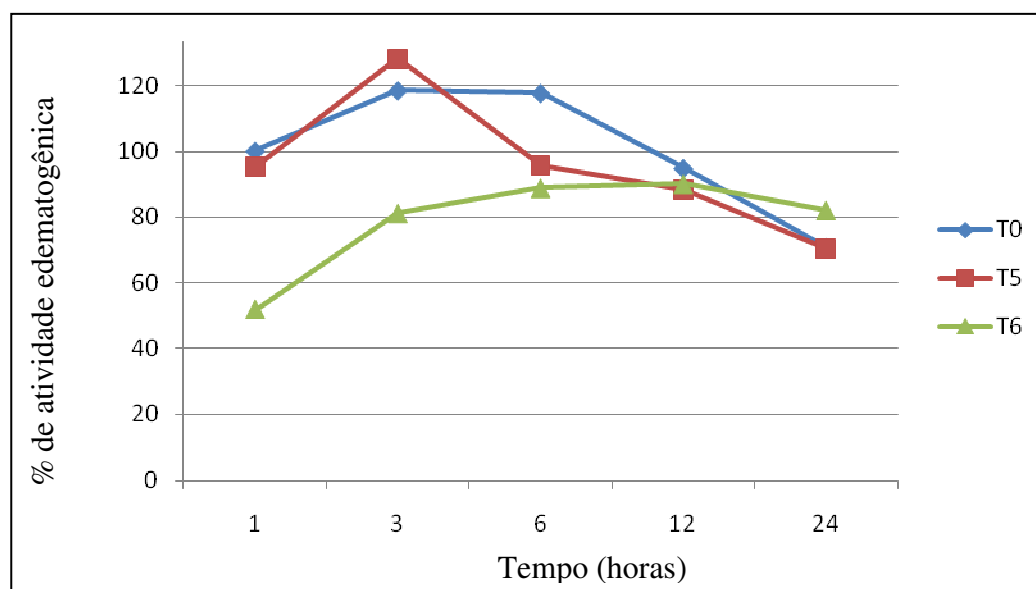


Gráfico 07– Atividade edematogênica do veneno (10 µg) autoproteolisado a 37°C de *B. atrox* por uma semana em tampão COLAGENASE: T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h).

A diferença de potência na indução do edema das amostras do veneno de *B. atrox* após incubação a 37°C nas soluções tampão usadas, pode estar correlacionada com a maior quantidade de metaloproteínas não degradadas após incubação em

tampão COLAGENASE. É possível que a composição do tampão colagenase pode também ter influenciado nessa atividade das amostras do veneno de *B. atrox*.

4.2.8 Avaliação da Letalidade do veneno autoproteolísado

4.2.8.1 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

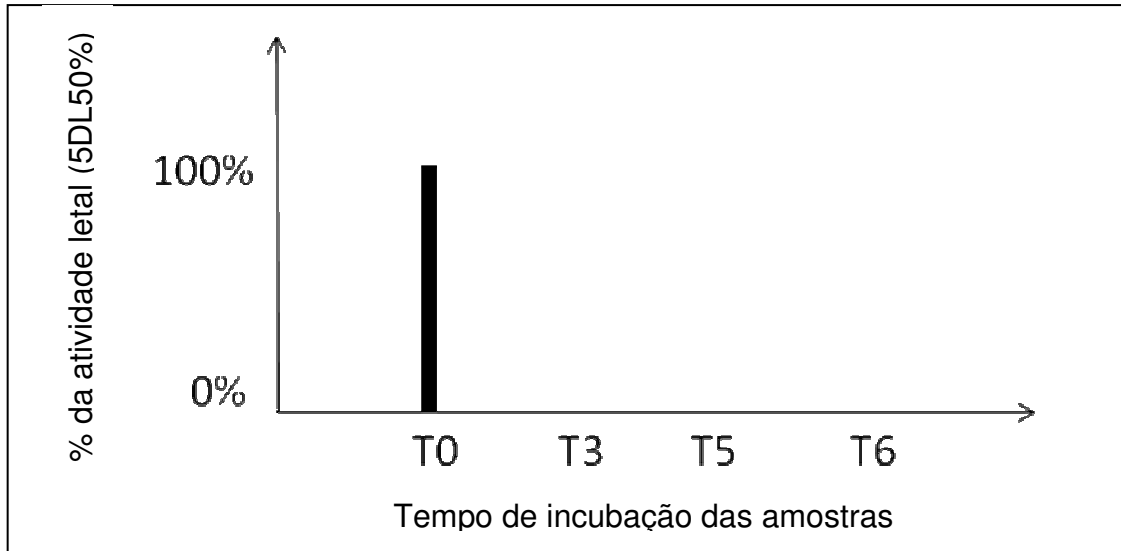


Gráfico 08– Avaliação da letalidade após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (25 mg/kg) de *B. atrox* em tampão PBS; T0 (zero h), T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Porcentagem de indivíduos que chegaram ao óbito em 24 horas.

O grupo de camundongos que foi injetado com 5DL50% (25 mg/kg) do veneno não autoproteolisado T0 morreu até 24 horas depois, enquanto que os grupos que receberam os venenos autoproteolisados a 37°C; T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (168 h) não morreram até 24 horas após a injeção (Gráfico 03).

Um grupo de camundongos foi injetado com 10DL50% (50 mg/kg) do veneno T6 (168 h) e não chegou ao óbito até 24 horas após a injeção, e não foi detectada atividade hemorrágica na região abdominal onde o veneno foi injetado.

De acordo com os perfis moleculares (eletroforeses uni e bidimensionais) e das avaliações biológicas do veneno autoproteolisado a 37°C de *B. atrox* por uma semana em tampão PBS, o veneno apresenta decréscimo das atividades proteolíticas, hemorrágicas e edematogênicas, o que contribui com a ausência de atividade letal após 24 h (T3) de incubação a 37°C

4.2.8.2 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

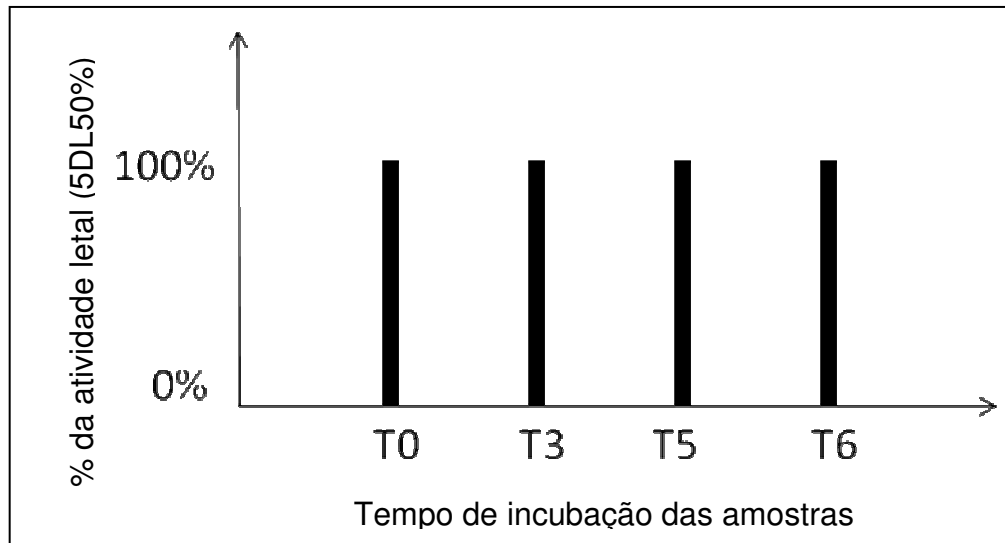


Gráfico 09– Avaliação da letalidade após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (25 mg/kg) de *B. atrox* com tampão COLAGENASE; T0 (zero h), T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (1 semana). Porcentagem de indivíduos que chegaram ao óbito em 24 horas.

Todos os grupos de camundongos que foram injetados com 5DL50% (25 mg/kg) do veneno não autoproteolisado T0 (zero h) e autoproteolisados; T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (168 h) morreram em 24 horas (Gráfico 09) e necropsia da região abdominal mostrou hemorragia significativa.

A atividade letal do veneno autoproteolisado de *B. atrox* por uma semana em tampão COLAGENASE é mais potente que a do veneno autoproteolisado com tampão PBS.

Esse efeito pode estar correlacionado com a maior quantidade de metalproteinases não degradadas de 50 kDa presentes ainda nas amostras do veneno de *B. atrox* após incubação a 37°C por uma semana. A maior quantidade dessas metalproteinases foi detectada por eletroforese uni e bidimensionais (Figuras 11 e 13)

4.3 Imunização de animais de laboratório - Produção de plasma hiperimune experimental

Camundongos (*Mus musculus*) foram imunizados (Figura 22) com amostras do veneno de *B. atrox* não autoproteolisado T0 (zero h) ou autoproteolisados T5 (72 h) e T6 (168 h) em tampão PBS, pH 7,2 ou COLAGENASE pH 7,5, gerando soros hiperimunes experimentais antibotrópicos ST0pbs, ST5pbs e ST6pbs, para camundongos imunizados com veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão PBS, pH 7,2; e ST0col, ST5col e ST6col, para camundongos imunizados com veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão COLAGENASE, pH 7,5.



Figura 22 – Produção de plasma hiperimune experimental. Grupos de camundongos imunizados para a obtenção de soro hiperimune experimental.

4.4 Análise imunológica por *Western blotting*

4.4.1 Venenos autoproteolisados em tampão COLAGENASE, pH 7,5

4.4.1.1 *Western blotting* com soro antiofídico

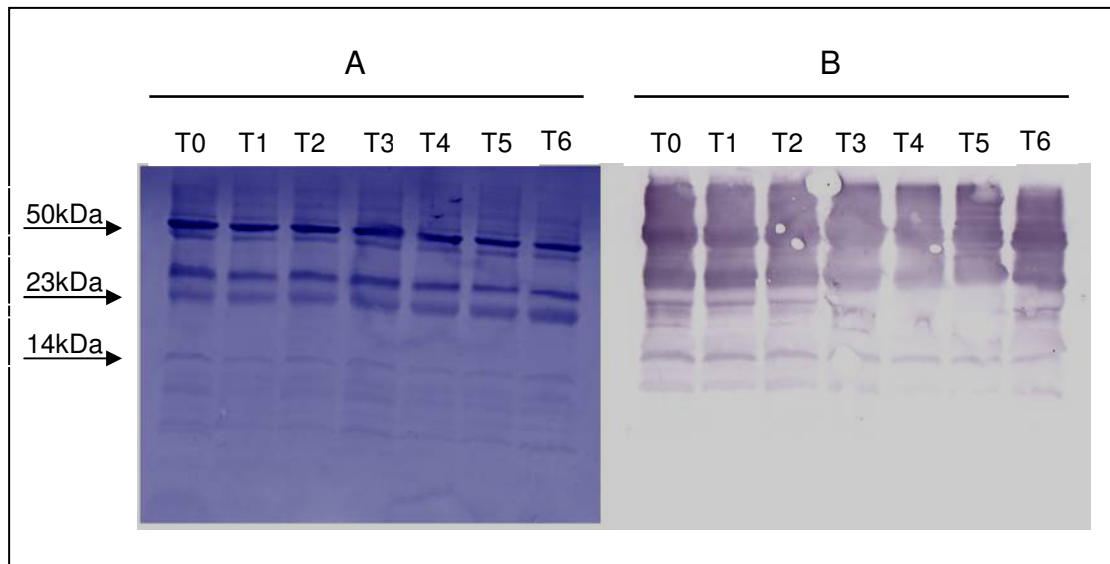


Figura 23– (A) Perfil eletroforético Tris-Tricina com glicerol – SDS-PAGE após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (40 µg) de *B. atrox* em tampão COLAGENASE em condições não redutoras: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Gel corado com *Coomassie Blue R-250*. (B) Imunoperfis do veneno de *B. atrox* não reduzido com anticorpos policlonais do soro antiofídico de cavalo (INSTITUTO BUTANTAN). Padrão dos marcadores de massa molecular do veneno de *Bothrops atrox*.

O imunoperfil com soro antiofídico (INSTITUTO BUTANTAN) do veneno não autoproteolisado T0 (zero h) ou autoproteolisados T5 (72 h) e T6 (168 h) de *B. atrox* (Figura 23) por uma semana em tampão COLAGENASE, pH 7,5 detectou proteínas maiores que 14 kDa, comprovando uma alta interação antígenos-anticorpos. Peptídeos abaixo de 14 kDa não foram detectados, isso sugere que após o processo de autoproteólise, as toxinas do veneno ainda apresentam epítomos que são reconhecidos pela IgG do antiveneno botrópico.

4.4.2 Venenos autoproteolisados em tampão PBS (100 mM), pH 7,2

4.4.2.1 Western blotting com soro antitoxico

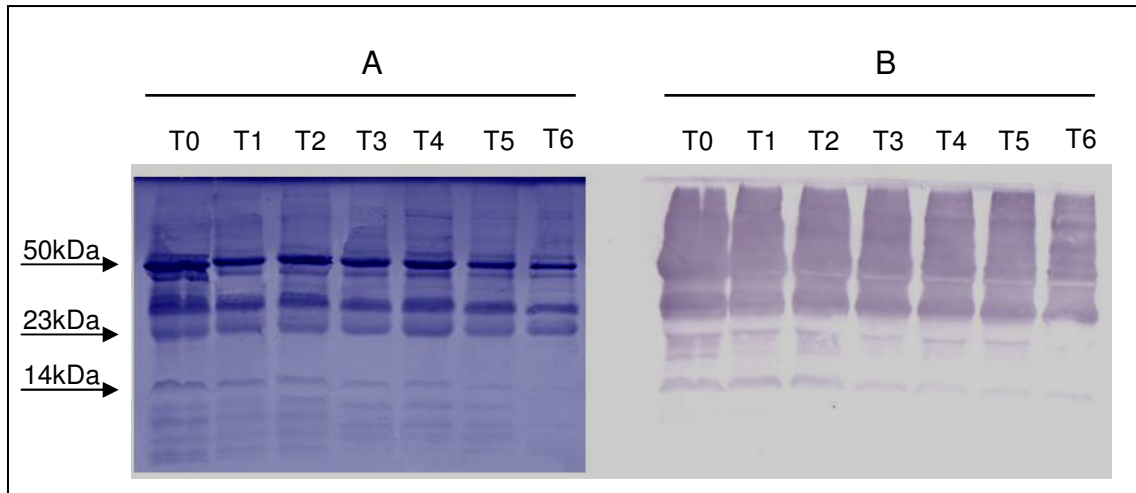


Figura 24 – (A) Perfil eletroforético Tris-Tricina com glicerol– SDS-PAGE após diferentes tempos de incubação a 37°C das amostras do veneno (40 µg) de *B. atrox* com tampão PBS em condições não redutoras: T0 (zero h), T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (24 h), T4 (48 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Gel com corado com *Coomassie Blue R-250*. (B) Imunoperfis do veneno de *B. atrox* não reduzido com anticorpos policlonais do soro antitoxico de cavalo (INSTITUTO BUTANTAN). Uso padrão dos marcadores de massa molecular do veneno de *Bothrops atrox*.

O imunoperfil com soro antitoxico (INSTITUTO BUTANTAN) do veneno não autoproteolisado T0 (zero h) ou autoproteolisados T5 (72 h) e T6 (168 h) de *B. atrox* (Figura 24) por uma semana em tampão PBS, pH 7,2 detectou proteínas maiores que 14 kDa, porém quanto maior o tempo de autoproteólise diminuiu-se a intensidade das bandas detectadas, o que sugere uma diminuição da quantidade de interações antígeno-anticorpo. Peptídeos abaixo de 14 kDa não foram detectados.

A maior interação antígeno-anticorpo (IgG do soro antitoxico) detectado após autoproteólise das toxinas do veneno em tampão COLAGENASE, sugere que houve uma maior preservação das estruturas (epítomos das toxinas) com essa solução tampão quando comparada após incubação com tampão PBS.

4.4.2.2 Western blotting com soro hiperimunes experimentais

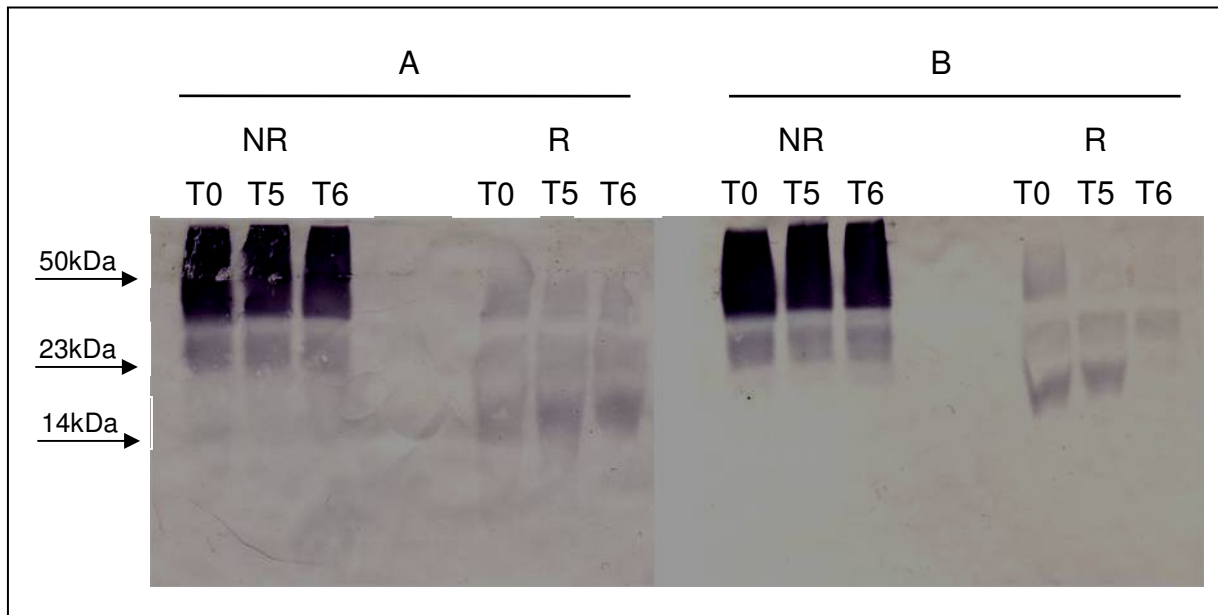


Figura 25 – Imunoperfis com anticorpos policlonais de soro hiperimune experimental de camundongos imunizados com veneno de *B. atrox* T0 (A) e T6 (B). Em condições não redutoras (NR) e redutoras (R). Amostras de veneno (40 µg) de *B. atrox*, T0 (zero h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Padrão dos marcadores de massa molecular do veneno de *Bothrops atrox*.

O imunoperfil do veneno de *B. atrox* não autoproteolisado T0 (zero h) ou autoproteolisados T5 (72 h) e T6 (168 h) em tampão PBS, pH 7,2 por uma semana (Figura 25), detectou interação antígeno-anticorpo com os anticorpos policlonais do soro hiperimune experimental de camundongos imunizados com veneno de *B. atrox* não-autoproteolisado T0 (Figura 25-A) e autoproteolisado T6 (Figura 25-B). Foi detectada interação de proteínas maiores que 14 kDa, porém quanto maior o tempo de autoproteólise diminui-se a intensidade das bandas detectadas, tanto em condições reduzidas (R) e não reduzidas (NR). Peptídeos abaixo de 14 kDa não foram detectados.

As interações antígeno-anticorpo diferem quando comparados em condições redutoras e não redutoras para ambos os soros. A interação é fraca em condições reduzidas e bastante intensa em não reduzida. Sugere-se que isso se deve aos antígenos possuírem maior número de epítomos conformacionais que lineares, e quando submetidos à condições reduzidas perdem a conformação responsável pela interação. Alguns peptídeos de baixa massa molecular que poderiam apresentar

epítomos lineares e/ou conformacionais são perdidos durante a eletroforese e não são detectados por *western blotting*.

4.5 Avaliação da Eficácia Neutralizante dos soros hiperimunes experimentais

4.5.1 Avaliação da Neutralização da Atividade Hemorrágica

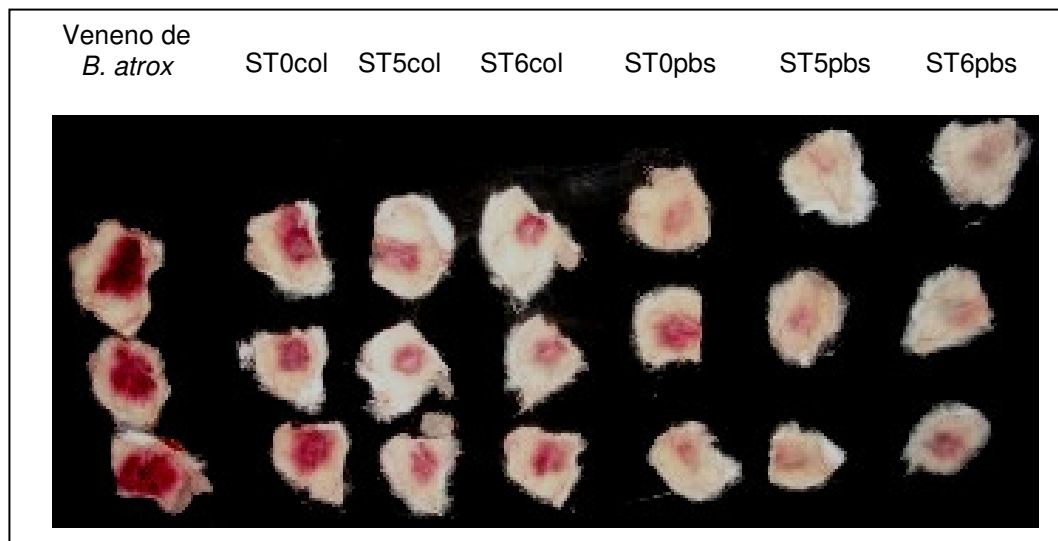


Figura 26 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox* (10 µg) com os soros hiperimunes experimentais (3:1); ST0pbs, ST5pbs e ST6pbs, para camundongos imunizados com veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão PBS, pH 7,2; e ST0col, ST5col e ST6col, para camundongos imunizados com veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão COLAGENASE, pH 7,5. Controle: veneno de *B. atrox* (10 µg).

Segundo a figura 26, constatou-se que os soros obtidos do veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão PBS, pH 7,2 obtiveram uma maior eficácia neutralizante do que o soro obtido do veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão COLAGENASE, pH 7,5.

Dentre os soros obtidos com o veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão PBS o que houve a maior neutralização foi o ST6pbs (Tabela 11) e dentre os soros obtidos com o veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão COLAGENASE o que houve a maior neutralização foi o ST6col (Tabela 12), e entre o soro ST6col e o ST6pbs, o que teve a maior atividade neutralizante (63,1%) foi o ST6pbs.

Tabela 11 – Neutralização da atividade hemorrágica pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão PBS.

Soro hiperimune	Média (halo/mm ²)	% Atividade Neutralizante	Intensidade Hemorrágica
---	1,9 ± 0,1	----	++++
ST0pbs	0,9 ± 0,1	49,1	++
ST5pbs	0,7 ± 0	61,4	+
ST6pbs	0,7 ± 0,2	63,1	+

- Razão do soro hiperimune experimental (µl)/veneno (µg) 3:1. Dose desafio: 10 µg do veneno de *B. atrox*.

Tabela 12 – Neutralização da atividade hemorrágica pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão COLAGENASE.

Soro hiperimune	Média (halo/mm ²)	% Atividade Neutralizante	Intensidade Hemorrágica
---	1,9 ± 0,1	----	++++
ST0col	1,3 ± 0,5	29,8	+++
ST5col	1,1 ± 0,2	42,1	++
ST6col	0,8 ± 0	56,1	++

- Razão do soro hiperimune experimental (µl)/veneno (µg) 3:1. Dose desafio: 10 µg do veneno de *B. atrox*.

Os dados sugerem que a composição da solução tampão utilizada para preparar as amostras do veneno de *B. atrox* pode influenciar na interação do antígeno com o sistema imune, obtendo assim uma boa resposta imune (quando usado o tampão PBS) ou uma baixa resposta imune (quando usado o tampão COLAGENASE).

4.5.2 Avaliação da Neutralização da Atividade Fosfolipásica A₂

Os soros hiperimunes experimentais obtidos do veneno de *B. atrox* autoproteolisados com tampão PBS não obtiveram uma boa eficácia neutralizante para a atividade fosfolipásica A₂ (Tabela 13).

Tabela 13 – Neutralização da atividade fosfolipásica A₂ pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão PBS.

Soro hiperimune	[Veneno:Soro]	Média (halo/mm ²)	% Atividade Neutralizante
---	1:0	1,7 ± 0	---
ST0pbs	1:0,5	1,7 ± 0	2,8
	1:1	1,7 ± 0	2,8
	1:2	1,7 ± 0	2,8
ST5pbs	1:0,5	1,6 ± 0	8,5
	1:1	1,6 ± 0	8,5
	1:2	1,6 ± 0	5,7
ST6pbs	1:0,5	1,6 ± 0	5,7
	1:1	1,5 ± 0	11,4
	1:2	1,6 ± 0	8,5

Dose desafio: 10 µg do veneno de *B. atrox*.

4.5.3 Neutralização da Atividade Coagulante

Tabela 14 – Neutralização da atividade coagulante pelos soros hiperimunes de camundongos produzido pela imunização com amostras do veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão PBS.

Soro hiperimune	[Veneno:Soro]	Tempo de início (s)	% Atividade coagulante	% Atividade Neutralizante
---	1:0	40 ± 3	100	---
	1:0,5	61,6 ± 5	64,9	35,1
ST0pbs	1:1	88,3 ± 1,1	45,3	54,7
	1:2	101,3 ± 8,7	39,5	60,5
	1:0,5	77,3 ± 4,1	51,8	48,2
ST6pbs	1:1	105,3 ± 9,2	37,9	62,1
	1:2	122 ± 7	32,7	67,1

Dose desafio: 2 mg/ml do veneno de *B. atrox*.

O soro ST6pbs, obtido do veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão PBS, pH 7,2 obteve maior eficácia neutralizante da atividade coagulante sobre o fibrinogênio quando comparado ao soro ST0pbs. (Tabela 14).

4.5.4 Avaliação da Neutralização da Atividade Desfibrinogenante

Os soros obtidos do veneno de *B. atrox* autoproteolisado com tampão PBS, pH 7,2 (ST0pbs e ST6pbs) obtiveram eficácia neutralizante sobre a atividade desfibrinogenante. O soro hiperimune experimental que obteve a maior neutralização foi o ST6pbs (Tabela 15).

Tabela 15 – Neutralização da atividade desfibrinogenante do veneno de *B. atrox*.

Soro hiperimune	[Veneno:Soro]	Sangue Coagulável	Intensidade do coágulo
---	1:0	Não	-
ST0pbs	1:1	Sim	++
	1:2	Sim	+++
	1:3	Sim	+
ST6pbs	1:1	Sim	+++
	1:2	Sim	++++
	1:3	Sim	++++

Dose desafio: 10 µg do veneno de *B. atrox*. **Níveis de intensidade de sangue coagulável: não coagulável (-) pouco coagulável (+), razoavelmente coagulável (++) moderadamente razoável (+++) e coagulável (++++).

4.5.5 Avaliação preliminar da neutralização da letalidade do veneno *in natura* de *B. atrox* em camundongos imunizados com veneno não autoproteolisado (T0) e autoproteolisado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (100 mM) pH 7,2

Quando utilizado como dose desafio 3DL50% (300 µg), os camundongos imunizados com o veneno de *B. atrox* T0 (produzindo soro hiperimune experimental ST0pbs) e autoproteolisado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (produzindo soro hiperimune experimental ST6pbs), não morreram em 24 horas com ambos os adjuvantes utilizados, enquanto que o grupo controle (camundongos não imunizados) obteve 2/3 (66,6%) de letalidade em 24 h.

Quando utilizado como dose desafio 5DL50% (500 µg), os camundongos imunizados com o veneno de *B. atrox* T0 obtiveram maior resistência à letalidade utilizado o adjuvante Al(OH)₃, e os camundongos que foram imunizados com veneno de *B. atrox* autoproteolísado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (produzindo soro hiperimune experimental ST6pbs), não morreram nas primeiras 6 horas de avaliação experimental, enquanto que o grupo controle (camundongos não imunizados) obteve 100% de letalidade neste mesmo tempo avaliado (Tabela 16).

Isto sugere que o veneno autoproteolísado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (produzindo soro hiperimune experimental ST6pbs) de *B. atrox* induz uma boa resposta imune em camundongos, utilizando tanto o adjuvante de Freund quanto o Al(OH)₃.

Tabela 16 – Avaliação preliminar da neutralização da letalidade do veneno *in natura* de *B. atrox* em camundongos imunizados com veneno não autoproteolísado (T0) e autoproteolísado a 37°C por uma semana (T6) em tampão PBS (100 mM) pH 7,2.

		Adjuvante usado na imunização de camundongos			
		Adjuvante de Freund		Adjuvante de Al(OH) ₃	
		Camundongos mortos/Total de camundongos		Camundongos mortos/Total de camundongos	
Dose desafio (veneno <i>in natura</i>)	Antígeno Imunizante/soro hiperimune produzido	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas
		#	0/3	2/3	0/3
3DL50%*	T0/ST0pbs	0/3	0/3	0/3	0/3
	T6/ST6pbs	0/3	0/3	0/3	0/3
	#	3/3	---	3/3	---
5DL50%**	T0/ST0pbs	3/3	---	2/3	2/3
	T6/ST6pbs	0/3	1/3	0/3	3/3

*300 µg de veneno de *B. atrox* como dose desafio (15 mg/kg)

**500 µg de veneno de *B. atrox* como dose desafio (25 mg/kg)

grupo controle – camundongos não imunizados.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeitos da autoproteólise e de fatores físico-químicos nas atividades biológicas das toxinas do veneno de *Bothrops atrox*

O estado conformacional nativo de uma proteína é fundamental para que a mesma possa realizar função biológica específica, porém, uma alteração deste estado por agentes físico-químicos e/ou biológicos pode acarretar perda da função biológica dependendo da estrutura da proteína e o tempo de ação do agente desnaturante (CAMPBELL, 2001).

Neste trabalho estamos apresentando os efeitos de fatores físico-químicos (temperatura, pH e composição da solução tampão), proteólise e o tempo de ação dos fatores anteriormente descritos sobre as atividades biológicas e antigenicidade das toxinas protéicas do veneno de *B. atrox*.

Para esta finalidade usamos um conjunto de metodologias experimentais, como técnicas proteômicas, detecção de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* e técnicas de produção, detecção e avaliação de anticorpos policlonais contra as toxinas do veneno de *B. atrox*.

Na análise dos resultados da cinética de proteólise do veneno de *B. atrox* pelas suas próprias proteases, mediante técnicas de eletroforese uni e bidimensional, foram detectadas mudanças no perfil molecular das toxinas do veneno em ambas as soluções tampão usadas, tampão PBS (100 mM, azida de sódio 0,02%) pH 7,2 e tampão COLAGENASE (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM) pH 7,5

Os resultados obtidos sugerem principalmente variações na intensidade e quantidade de toxinas com massa molecular de 14, 23 e 50 kDa. Essas toxinas sofrem um decréscimo quantitativo em ambas as soluções tampão utilizadas segundo o tempo de incubação, porém as toxinas de 50 kDa (faixa de pI 4~ 5) não foram totalmente degradadas em tampão COLAGENASE, enquanto efeito contrário

foi observado quando o veneno foi incubado em tampão PBS. As toxinas de 14 e 23 kDa tiveram menor degradação proteolítica no tampão COLAGENASE.

Durante a avaliação da cinética do processo proteolítico foi observado o surgimento de forma quantitativa de uma nova banda de proteínas de 30 kDa quando usado o tampão COLAGENASE. Esse mesmo processo foi detectado em menor intensidade quando foi usado tampão PBS. Proteínas de 40 kDa foram detectadas em eletroforese unidimensional não redutora após incubação por uma semana em tampão PBS, e não detectadas após incubação em tampão COLAGENASE. Mas em condições redutoras essa proteína de 40 kDa não foi detectada, sugerindo serem proteínas associadas por pontes de dissulfeto derivada da proteólise parcial da proteína de 50 kDa.

Similar padrão eletroforético do veneno de *B. atrox*, obtido após a incubação do veneno a 37°C, foi reportado por López-Lozano *et al.* (2002) que verificaram que a análise dos padrões eletroforéticos das amostras de veneno de *B. atrox* incubado em tampão PBS (0,01 M), pH 7,4 por 24 h mostrou que a metaloproteinase de 50 kDa foi degradada, e surgiram novas proteínas de 27 e 37 kDa. Mas também foi detectada a diminuição na intensidade da proteína de 23 kDa. A diferença das proteínas detectadas com massa molecular de 27 e 37 kDa para 30 e 40 kDa (nossos resultados) deve-se possivelmente às diferenças da trama (porosidade) dos géis SDS-PAGE usados em ambos os experimentos.

Sousa *et al.* (2001), submeteram o veneno da serpente *Bothrops jararaca* a autoproteólise por 48 horas em água (pH 5,0) e Tris-HCl 5 mM (pH 8,5). O perfil molecular nos padrões eletroforéticos das amostras de veneno pré-incubadas em pH 5,0 mostrou-se relativamente estável, enquanto as amostras pré-incubadas em pH 8,5 apresentaram progressivo desaparecimento das bandas de 45 a 66 kDa e o aumento das bandas de 14 a 29 kDa (SOUZA *et al.*, 2001). As análises dos nossos resultados sugerem de forma geral, similares perfis moleculares do veneno de *B. atrox* após autoproteólise no tampão COLAGENASE ao perfil molecular do veneno de *B. jararaca* após incubação em tampão Tris (5 mM) pH 8,5.

Baseado na organização do domínio estrutural e massa molecular, as metaloproteinases do veneno de serpentes podem ser classificadas em quatro classes, P-I à P-IV. As proteínas da classe P-I são compostas de “domínio protease” com massas moleculares baixas de ~25 kDa e usualmente com baixa ou sem atividade hemorrágica. A classe P-II consiste de “domínio protease” mais o domínio “desintegrina-símile” de ~10 kDa e a classe P-III que é representada por potentes hemorraginas de ~55 kDa, e possuem um terceiro “domínio rico em cisteínas” de ~14 kDa. A classe P-IV, com proteínas de cerca de 95 kDa, possui em adição aos domínios da classe P-III, um “domínio lecitina-símile” de ~15 kDa (MOURA-DASILVA *et al.*, 2003; FOX & SERRANO, 2005, 2008 e 2009).

López-Lozano *et al.* (2002), realizaram um estudo ontogenético de veneno de serpentes *B. atrox* capturadas em Manaus e o perfil eletroforético (SDS-PAGE) mostrou que as bandas mais intensas corresponderam a proteínas de 23 e 50 kDa, metaloproteinases de classe P-I e P-III, respectivamente. Essas observações foram confirmadas por Guércio *et al.* (2006), que realizaram o proteoma da variação ontogenética do veneno de *B. atrox*, detectando a variação quantitativa das metaloproteinases de 50 e 23 kDa durante o desenvolvimento ontogenético.

Moura-da-Silva *et al.* (2003), submeteram a jararagina, metaloproteinase de classe P-III isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, sob condições reduzidas, a autólise em tampão Tris/HCl (20 mM) pH 6,8, contendo 1 mM CaCl₂ a 25 °C por 11 dias e detectaram o surgimento de proteínas de ~28 e ~43 kDa. A proteína de 28 kDa compreende a jararagina-C liberada após autólise da jararagina de 52 kDa. A jararagina-C é formada pelo domínio “desintegrina-símile” e “domínio rico em cisteínas”.

As análises dos nossos resultados sugerem de forma geral, similares perfis moleculares do veneno de *B. atrox* após autoproteólise nos tampões básicos usados ao perfil molecular do veneno de *B. jararaca* após incubação em tampão Tris/HCl (20 mM), pH 6,8, mas existe a possibilidade que a variação nas massas moleculares dos produtos da proteólise seja devido a serem venenos procedentes de espécies diferentes e/ou as diferentes condições dos géis SDS-PAGE. Assim sugere-se que a

proteína de 30 kDa pode corresponder a uma jararagina-C-*símile* originada pela autólise das metaloproteinases de classe P-III de 50 kDa do veneno de *B. atrox*.

A hemorragia é uma característica comum produzida pelo veneno do gênero *Bothrops*. Os principais fatores para essa atividade são as hemorraginas, metaloproteinases dependentes de Zn^{2+} para sua atividade proteolítica sobre os constituintes da membrana basal dos vasos sanguíneos.

Neiva *et al.* (2009), realizaram a primeira análise do transcriptoma de *B. atrox* para a identificação das proteínas presentes na glândula de veneno, e detectaram a predominância de metaloproteinases (59% das toxinas), confirmando os padrões obtidos por métodos proteômicos. O padrão de expressão dos RNAm do veneno de *B. atrox* foi semelhante ao de *Bothrops insularis*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* em termos de classe de toxina, embora algumas diferenças tenham sido observadas. O veneno de *B. atrox* mostrou uma maior quantidade de metaloproteinases (61,6% das toxinas) quando comparado às outras espécies. Esse fato sugere a intensa ação hemorrágica do veneno observada em animais de experimentação e/ou em pacientes vítimas de acidente ofídico por *B. atrox*.

A comparação dos perfis moleculares obtidos por eletroforese uni e bidimensionais do veneno autoproteolisado em tampão PBS (100 mM) pH 7,2, e tampão COLAGENASE (50 mM) pH 7,4, demonstra segundo tempo de incubação a 37°C, que em tampão COLAGENASE as proteínas hemorrágicas (23 e 50 kDa) estão em maior quantidade que no veneno autoproteolisado em PBS. Assim a menor toxicidade das atividades biológicas do veneno autoproteolisado em tampão PBS e uma alta toxicidade nas atividades biológicas (proteolíticas, hemorrágicas, edematogênicas e letal) do veneno autoproteolisado em tampão COLAGENASE pode estar principalmente correlacionada com a presença no veneno de metaloproteinases (qualidade/quantidade) após o tempo de incubação em uma determinada solução tampão.

Moura-da-Silva *et al.* (2008), sugerem que a ligação da metaloproteinase hemorrágica jararagina de classe P-III, de veneno de serpentes (SVMPs) ocorre através de uma região localizada no subdomínio Da, da “desintegrina-*símile*” que

permite acúmulo de moléculas de toxinas no local da injeção, onde sua atividade catalítica leva a uma hemorragia local. Toxinas desprovidas dessa região estariam mais disponíveis de serem vascularizadas, levando a um efeito sistêmico pró-coagulante.

A maior perda do domínio de desintegrina-*símile* nas metaloproteinases de 50 kDa quando incubadas em tampão PBS pode ser uma das causas de não ter sido detectada atividade hemorrágica local do veneno de *B. atrox* quando avaliada *in vivo* na pele dos camungongos.

Gutierrez *et al.* (1995), detectaram que metaloproteinases de classe P-I de veneno de serpentes (SMVPs) causam inflamação utilizando a metaloproteinase BAP1 da *Bothrops asper*, e mostraram que a mesma induziu edema de pata em camundongos. Clissa (2002), avaliou a atividade edematogênica (indução do edema da pata) da jararagina, metaloproteinase de classe III, e constatou que a mesma desencadeia também processo inflamatório. Estas metaloproteinases (hemorrágicas ou não) induziram na derme a formação de bolhas, infiltração de leucócitos, macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias (RUCAVADO *et al.* 1998, 1999, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2005, 2009; FERNANDES *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Experimentalmente nossos resultados demonstraram intensa atividade edematogênica do veneno autoproteolizado em tampão COLAGENASE, fato este que pode ser explicado devido à quantidade de proteínas de 23 e 50 kDa mantidas mesmo após uma semana de proteólise, enquanto que com o veneno incubado em tampão PBS, houve uma gradativa redução da atividade edematogênica que pode ser explicada com a degradação das metaloproteinases de 23 e 50 kDa conforme visto nos perfis uni e bidimensionais.

No presente trabalho, quando comparado, o número de proteínas detectadas, segundo o tampão usado no processo de autoproteólise das toxinas do veneno, foi detectado maior número de proteínas em todas as amostras avaliadas quando foi usado o tampão COLAGENASE. As análises desses resultados sugerem que a composição das soluções tampão poderia ter um efeito diferencial sobre as

proteases (metaloproteinases e serino proteases) na degradação por autoproteólise dos constituintes do veneno.

Ao longo do tempo, detergentes surfactantes têm sido considerados como não-desnaturantes de proteínas específicas. Na concentração relativamente baixa, surfactantes não iônicos melhoram a atividade enzimática, enquanto que em alta concentração, agem como inibidores da atividade enzimática por que: (I) podem competir com o substrato pelo sítio ativo, (II) podem mudar o ambiente em que a enzima age, e (III) as micelas de detergente isolam a proteína de tal forma que esta não pode interagir com o substrato (SAVELLI *et al.*, 2000).

Detergentes surfactantes podem melhorar a atividade e/ou estabilidade de algumas enzimas e podem interagir com a enzima e causar uma mudança no estado conformacional de uma forma mais ativa e/ou estabilizá-la, por isso, são considerados como não desnaturantes protéicos (SAVELLI *et al.*, 2000; MCLOUGHLIN *et al.*, 1978; HOSHINO e TANAKA, 2003; GEBICKA & GRUDZINSKA, 2004), embora essa propriedade pode depender da solução tampão usada, concentração do detergente e a estrutura da proteína.

O surfactante polioxietileno lauril éter - Brij 35 (Figura 27) é um detergente não iônico útil para a solubilização e isolamento de proteínas (AHMAD *et al.*, 2007; BLUMENKRANTZ *et al.*, 1984; HILGREN & ALDÉN, 2002).

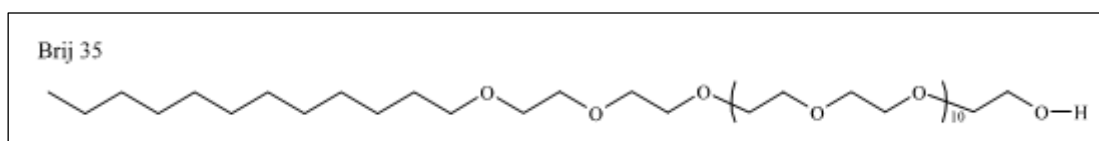


Figura 27 – Fórmula estrutural do Brij 35: (C₂H₄O)₂₃C₁₂H₂₅OH (HILGREN & ALDÉN, 2002).

Gebicka & Jurgas-Grudzinska (2004), fizeram um estudo da atividade e estabilidade da catalase na presença de Brij 35 (0,06 mM) e detectaram que a enzima na presença de Brij 35 mantém sua atividade plena. Brij 35 em baixas concentrações aumenta 1,5 vezes a atividade citoplasmática de glicerol 3-fosfato - desidrogenase (McLoughlin *et al.*, 1978) e 1,8 vezes a atividade da α -amilase do *Bacillus amyloliquefaciens* (Hoshino & Tanaka, 2003).

Foti *et al.* (1975), relataram que a enzima fosfatase prostática ácida não consegue hidrolisar monofosfato de timolftaleína, porém quando se adiciona Brij 35 (0,004 mM) à solução, a enzima é capaz de hidrolisar monofosfato de timolftaleína, ou seja, o Brij 35 favorece uma associação específica enzima-substrato que permite a atividade catalítica da enzima.

Hilgren & Aldén (2002), estudaram a conservação do lactato desidrogenase (LDH) com o Brij 35 (0,004 mM) e constataram que durante processo de congelamento-descongelamento, o detergente Brij 35 protegera o LDH de desnaturação, pois ele compete com as moléculas de proteína pela superfície de contato com os cristais de gelo.

Similar resultado também foi detectado por Anchordoquy *et al.* (2001), que estudando a conservação de LDH com diferentes detergentes Brij 35 e tween 80 (1, 0,2 e 0,05 mM) durante processo de congelamento-descongelamento observaram que ambos detergentes foram capazes de conservar a estrutura quaternária do LDH.

Ahmad *et al.* (2007), estudaram o efeito dos detergentes SDS (aniônico), CTAB (catiônico), CHAPS (*zwitterionic*) e Brij 35 (0,07 mM) na estrutura tridimensional da concanavalina A em pH 7, e detectaram que o detergente Brij 35 foi o que mais manteve a estrutura tridimensional da concanavalina A dentre os detergentes testados.

Metaloproteinases são conhecidas por sua maior estabilidade na presença de íons de cálcio. Em baixas concentrações de íons de cálcio (1 a 100 μ M), jararagina sofre autólise para surgir jararagina-C (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2003). A autólise diminui com o aumento da concentração de íons de cálcio, quando a estrutura da jararagina é estabilizada pelo cálcio.

Assim, o tampão COLAGENASE usado em nosso trabalho, que apresenta na sua composição Brij 35, CaCl₂, contribui de forma mais eficaz em preservar estrutura/função principalmente das metaloproteinases do veneno de *B. atrox*.

As metaloproteínases do veneno de serpentes são conhecidas por serem mais ativas em pH neutro e ligeiramente alcalino (Gomis-Ruth *et al.*, 1994). Marques-Porto *et al.* (2008), mostram que a atividade das metaloproteínases (Bothropasin) do veneno de *B. jararaca* é maior em pH ligeiramente alcalino que em pH ácido. A partir disso podemos dizer que o pH de ambas as soluções tampão utilizadas, também é um importante fator potencializador da atividade das metaloproteínases do veneno, embora a presença do Brij 35 e CaCl₂ no tampão COLAGENASE ter influenciado nas melhores condições físico-químicas para a atividade das metaloproteínases do veneno de *B. atrox*.

O fato de o Brij 35 auxiliar na ativação e/ou estabilidade das proteínas, principalmente das metaloproteínases, sugeria ser uma das principais causas para que o veneno de *B. atrox* autoproteolísado em tampão COLAGENASE ter sua toxicidade menos diminuída em relação ao veneno autoproteolísado em PBS.

Posterior experimento (Figura 28) foi realizado incubando-se por uma semana (segundo item 3.4) veneno de *B. atrox* com tampão PBS incluindo somente o Brij 35 (0,2 mM) detectando-se intensa hemorragia quando comparado ao resultado obtido com incubação somente com PBS (Figura 19-A). Esse resultado confirma a importância do Brij 35 na manutenção da estrutura/atividade das metaloproteínases hemorrágicas do veneno de *B. atrox*.

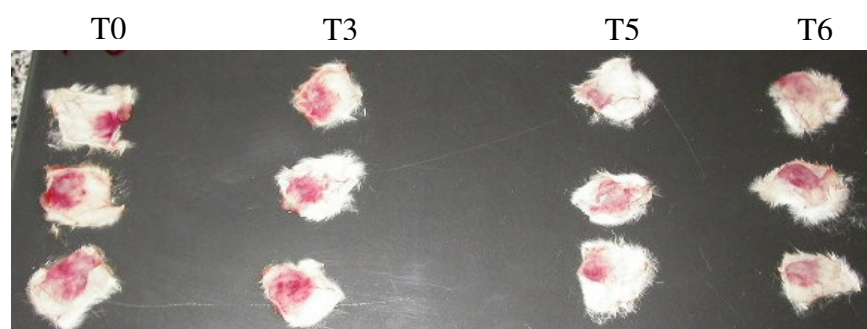


Figura 28- Atividade hemorrágica após diferentes tempos de incubação das amostras do veneno (10 µg) de *B. atrox* após autoproteólise a 37°C em tampão PBS com Brij 35, pH 7,2: T0 (zero h), T3 (24 h), T5 (72 h) e T6 (168 h). Controle: veneno tempo zero (T0).

5.2 Efeitos da autoproteólise e de fatores físico-químicos na antigenicidade das toxinas do veneno de *Bothrops atrox*

Antigenicidade é a capacidade de um antígeno desencadear resposta imune (produção de anticorpos). Primeiramente, para que isso ocorra, na primeira exposição do antígeno que induz resposta imune adaptativa, este tem que ser reconhecido pelos linfócitos T e B. O antígeno exógeno (em nosso caso as toxinas do veneno de *B. atrox*) deve ser fagocitado por células apresentadoras de antígenos (APCs), e no seu interior, degradado a peptídeos de 12 a 20 resíduos de aminoácidos, posteriormente ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe II) que vai levá-los à superfície das APCs para serem reconhecidas pelos linfócitos T auxiliares (CD4) que irão estimular linfócitos B que vão se diferenciar em plasmócitos e células B de memória. *A posteriori* os plasmócitos secretarão anticorpos específicos que reconhecerão os antígenos exógenos no citoplasma. Uma vez reconhecidos, o sistema imune desencadeará a resposta imune aos antígenos exógenos, produzindo no primeiro contato anticorpos de classe IgM, e a partir de um segundo contato anticorpos da classe IgG (FEILI-HARIRI *et al.*, 2005; STEELE *et al.*, 2006).

O presente trabalho se prestou a avaliar a antigenicidade do veneno de *B. atrox*, autoproteolisado por até uma semana em tampão PBS e em tampão COLAGENASE.

As amostras do veneno de *B. atrox* autoproteolisado por uma semana em tampão PBS e em tampão COLAGENASE foram avaliadas por técnica de *western blotting* para detectar sua capacidade de interação antígeno-anticorpo com o soro antibotrópico (INSTITUTO BUTANTAN). Para ambas as amostras, essa interação toxinas-IgG foi detectada de forma intensa em todas as amostras após os tempos de incubação experimentais. Este resultado representava que mesmo que o veneno esteja degradado pelas suas próprias proteases por uma semana, ainda assim, possui capacidade de ligar-se a anticorpos do soro antibotrópico (INSTITUTO BUTANTAN). Isto sugere que algumas regiões responsáveis por resposta imune (epítomos) não tenham sido atingidas pela proteólise.

Soros hiperimunes experimentais foram produzidos através da imunização de animais de laboratório (*Mus musculus*) com o veneno de *B. atrox* autoproteolisado ou não (T0, T5 ou T6) em tampão PBS ou tampão COLAGENASE, e dentre estes, o soro obtido do veneno de *B. atrox* autoproteolisado por uma semana em tampão PBS, obteve uma maior atividade neutralizante da atividade hemorrágica do veneno *in natura* de *B. atrox*, quando comparado com o soro produzido com veneno autoproteolisado em tampão COLAGENASE.

A análise imunológica por *western blotting*, sob condições reduzidas e não reduzidas, do veneno de *B. atrox* (T0, T5 e T6) autoproteolisado em tampão PBS, com os soros hiperimunes experimentais (ST0pbs e ST6pbs), detectou que as interações antígeno-anticorpo do soro ST6pbs foram mais intensas que com o soro ST0pbs. Foi detectado também que o soro ST6pbs foi o que obteve maior potência neutralizante das atividades hemorrágica, desfibrinogenante e letal.

Quando comparados os imunoperfis dos venenos em condições reduzidas e não reduzidas, a interação em condição reduzida foi fraca, enquanto que em condição não reduzida foi bastante intensa. Este fato sugere que isso se deve aos antígenos do veneno autoproteolisado possuírem maior número de epítomos conformacionais e/ou lineares, e quando submetidos à condições reduzidas perdem a conformação responsável pela interação, e/ou alguns epítomos lineares de massa molecular baixa são perdidos durante a eletroforese, e assim, não detectados por *western blotting*.

Assim sugere-se que as toxinas da amostra do veneno de *B. atrox* incubado por 168 h (T6) podem ter sido as mais degradadas pelas suas próprias proteases do veneno gerando maior quantidade/qualidade de peptídeos imunogênicos e/ou epítomos lineares/conformacionais que podem ter interagido mais especificamente com o sistema imune induzindo uma maior diversidade qualitativa/quantitativa de IgG neutralizantes das toxinas *in natura* do veneno de *B. atrox*.

De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, sugere-se que o veneno autoproteolisado de *B. atrox* por uma semana em tampão PBS (T6), por possuir uma boa antigenicidade e baixa toxicidade possa vir a ser uma alternativa

para produção de soro hiperimune antibotrópico veterinário e/ou humano para o tratamento de acidente ofídico causado pela espécie amazônica *B. atrox*.

Atualmente a maioria das vacinas disponíveis é baseada no uso de patógenos inativados ou vivo-atenuados. No entanto, essas vacinas têm várias deficiências, como as dificuldades de cultivo *in vitro*, riscos biológicos, bem como a perda de eficácia devido a variações genéticas visto em muitos patógenos. Esses problemas podem, potencialmente, ser resolvidos pela imunização com peptídeos (epítomos) capazes de estimular células B, células T citotóxicas e as respostas imunes (OBEID *et al.*, 1995, 1996; PARTIDOS & STEWARD, 1992; PARTIDOS *et al.*, 1992; OLSZEWSKA *et al.*, 2000; OLSZEWSKA & STEWARD, 2001).

Fragmentos derivados de proteínas antigênicas específicas são empregados como potenciais vacinas, pois podem induzir resposta imune *in vitro* e *in vivo* (MACHADO *et al.*, 2004; GROOT & MOISE, 2007; EDITORIAL, 2004).

Klinger-Hamour *et al.* (2003), avaliou a antigenicidade de um peptídeo de 69 resíduos de aminoácidos, derivado do vírus respiratório sincicial humano (VRSH), e constatou que o mesmo provocou em camundongos a geração de anticorpos altamente protetores contra o VRSH, representando um novo antígeno potencial para a produção de vacina contra o VRSH.

As respostas imunes às células cancerosas podem ser obtidas *in vivo* pela administração de peptídeos sintéticos derivados de proteínas de células tumorais (antígenos tumorais associados - TAAs). Peptídeos derivados da TAAs são apresentadas para o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), células T citotóxicas (NK), que podem reconhecer e destruir células tumorais (STEELE *et al.*, 2006; WAGNER & DISIS, 2006).

Vacina com múltiplos peptídeos antigênicos (MAPs) de *Plasmodium falciparum* específicos contra a malária, foi testada em voluntários para avaliar sua antigenicidade. A formulação da vacina MAP/alum/QS-21 provocou elevados níveis de anticorpos específicos do parasita em 10 dos 12 voluntários. Esta é a primeira demonstração em humanos de que uma vacina de peptídeos contendo um mínimo

de peptídeos antigênicos, compostos de apenas 5 aminoácidos (N, A, V, D e P) pode induzir a produção de anticorpos comparáveis a múltiplas exposições ao *P. falciparum*. (NARDIN *et al.*, 2000).

Uma vacina para alergia foi produzida através da produção de peptídeos sintéticos que interagissem com anticorpos IgE. A vacina tem como alvo o sítio de ligação de IgE de alta afinidade para o receptor FcεRI, por meio da imunização ativa (WANG *et al.*, 2003).

Múltiplos peptídeos antigênicos (MAPs) contendo peptídeos derivados de 28 kDa da glutiona S-transferase de *Schistosoma mansoni* sintetizados possuem antigenicidade e efeitos protetores, sendo considerados como potenciais candidatos à vacina contra *S. mansoni* (HUANG *et al.*, 2005).

P6 (proteína de membrana) é um dos candidatos para a formulação de uma vacina contra infecção por *Haemophilus influenzae* (NTHi). No entanto, otite média em crianças que têm episódios recorrentes de otite média aguda devido à NTHi não respondem adequadamente a P6. Ishida *et al.* (2006), estudaram peptídeos reconhecíveis por células T (CD4) específicas, e detectaram que estes induziram resposta imune satisfatória contra a infecção por NTHi, através de alta produção de anticorpos e citocinas. Estes peptídeos podem ser candidatos para a formulação de uma vacina eficaz contra as infecções por NTHi, mesmo em crianças com otite média aguda (ISHIDA *et al.*, 2006).

Wagstaff *et al.* (2006), identificaram através da bioinformática as sequências de codificação de epítomos imunogênicos e estruturalmente importantes de uma biblioteca de cDNA do veneno da glândula da víbora africana *Echis ocellatus*. Focaram seu trabalho nas metaloproteinases, e identificaram sete epítomos que foram capazes de neutralizar a hemorragia induzida pelo veneno de *E. ocellatus*.

Sugere-se que novos estudos sejam efetuados purificando-se peptídeos/proteínas atóxicas de baixa massa molecular do veneno de *B. atrox* proteolisado por suas próprias proteases por uma semana em tampão PBS, e

testando suas atividades biológicas e antigênicas para produção de vacina antitoxigênica específica contra o veneno da serpente amazônica *Bothrops atrox*.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que:

PBS (100 mM, azida de sódio 0,02%), pH 7,2 ou em tampão COLAGENASE, pH 7,5 (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM)

- Segundo o tempo de autoproteólise nas soluções tampão utilizadas observou-se a degradação das toxinas de *B. atrox* principalmente das metaloproteinases das classes P-I (23 kDa) e P-III (50 kDa).
- A degradação, durante o tempo de incubação a 37°C, das metaloproteinases da classe P-III foi quantitativamente menor em tampão COLAGENASE (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM), pH 7,5 que no tampão PBS (100 mM, azida de sódio 0,02%), pH 7,2.
- Durante a cinética da autoproteólise das toxinas do veneno, foi detectado o surgimento de uma proteína de 30 kDa, que sugere ser uma jararagina C *símile* originada da proteólise das metaloproteinases da classe da classe P-III.
- O veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão PBS (100 mM, azida de sódio 0,02%), pH 7,2 possui suas atividades hemorrágica, proteolítica, edematogênica e letal acentuadamente diminuídas após uma semana de incubação a 37°C pela degradação rápida das metaloproteinases de 50 kDa.
- O veneno de *B. atrox* autoproteolisado em tampão COLAGENASE (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM), pH 7,5 possui suas atividades hemorrágica, proteolítica e edematogênica diminuídas após uma semana, porém ainda persistindo alta toxicidade e letalidade devido à presença principalmente das metaloproteinases da classe P-III.

- Os constituintes do tampão COLAGENASE (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM), pH 7,5 influenciam de forma positiva para proteger a estrutura/atividade das metaloproteinases do veneno de *B. atrox*.
- O Brij 35, constituinte do tampão COLAGENASE (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, azida de sódio 0,02% e Brij 35 0,2 mM), pH 7,5 é o principal fator que influencia na maior toxicidade do veneno de *B. atrox* autoproteolisado por uma semana a 37°C, pois protege as metaloproteinases do veneno da degradação e/ou de mudanças conformacionais no processo de congelamento-descongelamento.
- As toxinas degradadas após uma semana de incubação em tampão PBS (100 mM) pH 7,2 induziram em camundongos, potente resposta imunológica na produção de imunoglobulinas neutralizantes das atividades tóxicas do veneno *in natura* de *B. atrox*.
- Os resultados obtidos sugerem a possibilidade da aplicação biotecnológica do veneno autoproteolisado de *B. atrox* em tampão PBS (100 mM) pH 7,2, na produção de soros/vacinas antiofídicas e/ou como fonte de peptídeos imunogênicos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho servirá como base para novos estudos que possibilitem a purificação de proteínas e peptídeos de baixas massas moleculares, resultantes da proteólise sobre seus próprios constituintes das toxinas do veneno de *B. atrox* em tampão PBS (100 mM) pH 7,2 e avaliar sua antigenicidade para a possível produção de soros monoclonais/policlonais e vacina antibotrópica específica contra as toxinas do veneno de *B. atrox*.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2000.

ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2003.

AHMAD, E. *et al.* The Minimal Structural Requirement of Concanavalin A that Retains Its Functional Aspects. **J. Biochem.** **142**; 307–315, 2007.

ALBERTS, B., BRAY, D. LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.

AMABIS, J. M. & MARTHO, G. R. **Biologia dos organismos**. São Paulo: Editora Moderna, 2004.

ANCHORDOQUY, T. J. Maintenance of Quaternary Structure in the Frozen State Stabilizes Lactate Dehydrogenase during Freeze–Drying. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 390, 35-41, 2001.

BÉRNILS, R. S. (org.). **Brazilian reptiles – List of species**. Acessado em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 10/07/2009.

BIER, O. **Imunologia: básica e aplicada**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

BLUMENKRANTZ, N., ASSAD, R., PETERKOFISKY B. Characterization of Collagen Hydroxylsyl Glycosyltransferases As Mainly Intramembranous Microsomal Enzymes. **J. Biological Chemistry** 259, 854-859,1984.

BOLAÑOS, R. **Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro America**. ed. Universitária de Costa Rica, San José, 1984.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248,1976.

BRASIL. **Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

CALICH, V & VAZ, C. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Editora REVINTER, 2001.

CAMPBELL, M. K. **BIOQUÍMICA: EDIÇÃO UNIVERSITÁRIA**. 3. ed. Editora: Artmed, 2001.

CANTER, H. M., SANTOS, M. F., SALOMÃO, M. G., PUORTO, G., PEREZ JUNIOR, J. A. **Animais Peçonhentos: serpentes**. 2008.

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O MUNDO DA SAÚDE**. São Paulo, 2006.

CLISSA, P. B. Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

EDITORIAL. From genome to vaccine: new immunoinformatics tools for vaccine design. **Methods** **34**; 425–428, 2004.

FEILI-HARIRI, M., FALKNER, D. H., MOREL, P. A. Polarization of naïve T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations implications for immunotherapy. **J Leukocyte Biol.** **78**; 656-664, 2005.

FERNANDES, C. M. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon** **47**; 549–559, 2006.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3 ed. Cambridge University Press, 1971.

FOTI, A. G. *et al.* Enhancing Effect of Surfactant and Protein on Hydrolysis of Thymolphthalein Monophosphate by Purified Prostatic Acid Phosphatase. **CLIN. CHEM.** 21/12, 1761-1765, 1975.

FOX J. W. & SERRANO S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal** 275(12); 3016-30, 2008.

FOX J. W. & SERRANO S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics** **72**; 200-209, 2009.

FOX, J. W. & SERRANO, M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon** **45**; 969-985, 2005.

FRAGA, R. S. & NEUMANN, J. Complexo de Histocompatibilidade Principal. In: SCROFERNEKER, M. L., POHLMANN, P. R. (Ed.). **Imunologia básica e aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, cap.7, p.110-121, 1998.

FRANÇA, F. O. S. & FAN, H. W. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

GEBICKA L. & JURGAS-GRUDZINSKA M. Activity and Stability of Catalase In: Nonionic Micellar and Reverse Micellar Systems. **Z. Naturforsch** **59c**, 887-891, 2004.

GOMIS-RUTH, F. X. *et al.* Crystal structures, spectroscopic features, and catalytic properties of cobalt(II), copper(II), nickel(II), and mercury(II) derivatives of the zinc endopeptidase astacin. A correlation of structure and proteolytic activity. **J. Biol. Chem.** **269**; 17111–17117, 1994.

GROOT, A. S. & MOISE I. New tools, new approaches and new ideas for vaccine development. **Expert Rev. Vaccines** **6(2)**; 125-127, 2007.

GUÉRCIO, R. A. P. *et al.* Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science** **4:11**, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M., *et al.* Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp Mol Pathol** **62**; 28-41, 1995.

GUTIERREZ, J M. & LOMONTE B. Local Tissue Damage Induced by *Bothrops* Snake Venoms. A Review. **Memórias do instituto Butantan**, 51(4): 211-223, 1989.

GUTIERREZ, J. M. & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33(11): 1405-1424. 1995.

HILLGREN A. & ALDÉN M. A comparison between the protection of LDH during freeze-thawing by PEG 6000 and Brij 35 at low concentrations. **International Journal of Pharmaceutics** **244**; 137-149, 2002.

HOSHINO E. & TANAKA A. Enhancement of enzymatic catalysis of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by nonionic surfactant micelles. **J. Surfact. Deterg.** **6**; 299-303, 2003.

HUANG H.Q. *et al.* Synthesis and bioactivities of two multiple antigen peptides as potential vaccine against *Schistosoma*. **Bioorg. Med. Chem.** **15**; 2415–2419, 2005.

IWANAGA S & SUZUKI T. Enzymes in snake venom. In: **Snake Venom**, ed lee, C Y. Berlim: Springer-verlag; 61-158, 1979.

ISHIDA, I. *et al.* Identification of human T-cell epitopes and highly immunogenic analog peptides on the non-typeable Haemophilus influenzae P6 outer membrane protein. **Clinical immunology** **121**; 90-99, 2006.

JANEWAY, C. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Artmed. 2006.

KLINGUER-HAMOUR, C. *et al.* Synthesis, refolding and protective immune responses of a potential antigen for human Respiratory Syncytial Virus vaccine. **J. Peptide Res.** **62**; 27–36, 2003.

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

LIN, H. H. *et al.* Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: Applications for vaccine research. **BMC Immunology** 9:8, 2008.

LOMONTE, B., MORENO, E., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A., MACCARANA, M., Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparinbinding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem**; 269: 29867-73, 1994.

LÓPEZ-LOZANO, J. L. *et al.* Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon** 40; 997-1006, 2002.

LÓPEZ-LOZANO, J. L. **Venenos de serpentes da Amazônia – Propriedades e relações moleculares, fisiológicas e taxonômicas.** 180f. Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2002.

MACHADO, A. *et al.* Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Quím. Nova** 27, 2004.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. Review. **Toxicon** 36(12);1749-800, 1998.

MARQUES-PORTO, R. A., LEBRUN I. B., PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metalloproteinases and their intrinsic peptidic inhibitor. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 147; 424–433, 2008.

MCLOUGHLIN D. J., SHAHIED I. I., MCQUARRIE R. Detergents effects upon the isozymes of cytoplasmatic glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **Arch. Biochem. Biophys** 188; 78-82, 1978.

MEDINA P. & BARESI L. Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. **Journal of Microbiological Methods** 69; 391-393, 2007.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas d Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad júnior V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Savier; 33-61, 2003.

MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.* Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie** 90; 484-492, 2008.

MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.* Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 409; 395-401, 2003.

NASCIMENTO, G. N. *et al.* Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, 2009.08.009.

NASCIMENTO, N. & ROGERO, J. R. **Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante**. *Biotecnologia ciência & desenvolvimento*, v. 1, n. 2, p. 24-26, 1997.

NARDIN, E. H. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. **The Journal of infectious diseases** **182**; 1486-1496, 2000.

NEIVA, M. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon** **53**; 427-436, 2009.

NELSON, D.L. & COX, M.M., **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. Sarvier, Wisconsin, 2007.

NORRIS R. Venom Poisoning in North American Reptiles. In Campbell JA, Lamar WW. 2004. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 870 pp. 1500 plates p.489-506, 2004

OBEID, O.E. *et al.* Protection against morbillivirus-induced encephalitis by immunisation with a rationally designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of measles virus. **J. Virol.** **69**; 1420–1428, 1995.

OLSZEWSKA, W. & STEWARD, M. W. Nasal delivery of epitope based vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews** **51**; 161–171, 2001.

OLSZEWSKA, W. *et al.* Immune responses and protection induced by mucosal and systemic immunization with recombinant measles nucleoprotein in a mouse model of measles-induced encephalitis. **Arch. Virol.** **146**; 293–299, 2000.

PARDAL, P.P.O. & YUKI, R.N. **Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas**. Belém: ed. Universitária, 40p, 2000.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001.

PARTIDOS C. D., STANLEY, C., STEWARD, M. The influence of orientation and number of copies of T and B cell epitopes on the specificity and affinity of antibodies induced by chimeric peptides. **Eur. J. Immunol.** **22**; 2675–2680, 1992.

PARTIDOS, C. D. & STEWARD, M.W. The effects of a flanking sequence on the immune response to a B and a T cell epitope from the fusion protein of measles virus. **J. Gen. Virol.** **73**; 1987–1994, 1992.

PEAKMAN, M. & VERGANI, D. **Imunologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

PHELAN, D. L. The HLA System. In: HARMENING, D. M. (Ed.). **Modern blood banking and transfusion practices**. 4. ed., cap. 22. Philadelphia, 1999.

PINHO F. M. O., OLIVEIRA E. S., FALEIROS F. Acidente ofídico no Estado de Goiás. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 2004.

ROITT, I. M. & DELVES, P. J. **Fundamentos de imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América, in W B., E B. (eds); **Venomous Animals and their Venoms**. New York, Academic Press, 345-84, 1971.

RUCAVADO A., NUNEZ J., GUTIÉRREZ J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int J Exp Pathol** **79**; 245-254, 1998.

RUCAVADO, A. *et al.* Increments in cytokines and matrixmetalloproteinases in skeletal muscle after injection of tis-sue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm** **11**; 121-128, 2002.

RUCAVADO, A., *et al.* Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weakhemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon** **37**; 1297-1312, 1999.

SAVELLI, G., SPRETI, N., PROFIO, P. Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** **5**; 111-117, 2000.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE Protocol. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SCHARON, J. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 267p. 2000.

SCROFERNEKER, M. L. & POHLMANN, P. R. **Imunologia Básica e Aplicada**. Editora Sagra Luzzatto. Porto Alegre, 578p. 1998.

SILVA, M. V. **Serpentes do estado do Acre: riqueza, dieta, etno-conhecimento e acidentes ofídicos**. 2006.

SOERENSEN, B. **Acidentes por Animais Peçonhentos** Editora: Atheneu. 2000.

SOUSA, J. R. F., MONTEIRO, R. Q., CASTRO, H. C., ZINGALI, R. B., Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon** **39**; 787-792, 2001.

SOUZA, A. R. B. & MUNIZ, E. C. **Jararacas e Acidentes Ofídicos no Brasil: uma atualização simplificada**. Fundação de Medicina Tropical - FMT/IMT - AM, 2000.

STEELE, J. T., ALLEN, S. D., KAUMAYA, P. T. P. Cancer immunotherapy with rational designed synthetic peptides In: Edited by KASTIN, A. J. Handbook of biologically active peptides. Chapter 21; 491-498, 2006.

TEIXEIRA C. F. P. *et al.* Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **100**; 181-184, 2005.

TEIXEIRA, C. *et al.* Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, 05.026.2009.

THEAKSTON, R. D. G. The application of immunoassay techniques, including Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. **Toxicon** **21**: 341-352, 1983.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 391: 37-62. 1996.

WAGSTAFF, S. C. *et al.* Bioinformatics and multiepitope DNA immunization to design rational snake antivenom. **PLoS Med** **3(6)**: 2006.

WANG, C. Y. W., *et al.* Synthetic IgE peptide vaccine for immunotherapy of allergy. **Vaccine** **21**; 1580–1590, 2003.

WAGNER, M. W. & DISIS, M. L. Peptides vaccines for cancer treatment. In: Edited by KASTIN, A. J. Handbook of biologically active peptides. Chapter 21; 491-498, 2006.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3. ed. Porto Alegre, Editora Mercado Aberto, 2003.

INTRODUÇÃO

MATERIAIS E MÉTODOS

DISCUSSÃO

RESULTADOS

CONCLUSÃO

PERSPECTIVAS FUTURAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OBJETIVOS