

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLOS CORREA NETTO

**ESTUDO IMUNOQUÍMICO DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*, LACERDA,
1884 E IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOMARCADORAS COMO FERRAMENTA
PARA O DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICO.**

Dissertação apresentada à coordenação de pós-graduação do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

N476 Netto, Carlos Correa

Estudo imunoquímico do veneno de *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1984, e identificação de biomarcadores como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico / Carlos Correa Netto. – Rio de Janeiro, 2007.

xviii, 91 f. : il. ; 30 cm.

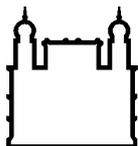
Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 85-91.

1. *Bothrops jararacussu*.
2. Mordeduras de cobra - diagnóstico.
3. Espectrometria de massa. I. Título.

CDD: 615.942

Trabalho realizado no Instituto Vital Brazil, no Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ e no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, sob a orientação dos Professores Dra. Débora Foguel e Dr. Salvatore Giovanni de Simone.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLOS CORREA NETTO

ESTUDO IMUNOQUÍMICO DO VENENO DE *B. JARARACUSSU*
(LACERDA, 1884) E IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOMARCADORAS
COMO FERRAMENTA PARA O DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICO

ORIENTADOR: Prof. Dra. Débora Foguel e Dr. Salvatore Giovanni de Simone

Aprovada em 09 de fevereiro de 2007

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Aníbal Rafael Melgarejo
Prof. Dr. Márcia Regina Soares
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Rio de Janeiro

Aos meus pais, Natanael Correa (in memorian) e
Maria da Penha Faria Correa, pelo amor,
pela compreensão e por todos os esforços
dedicados a minha formação, permitindo
que eu chegasse até aqui.

A minha querida irmã Renata Faria Correa
pelo companheirismo, estando ao
meu lado em todos os momentos
da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Vital Brazil, em especial aos Presidentes Solange Almeida e Carlos Minardi por todo o suporte dado ao projeto.

Ao Diretor Científico do IVB e amigo, Luiz Eduardo, que mesmo sem acreditar na aplicabilidade do meu projeto, não faltou em nenhum momento com o seu apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos de longa data, Aníbal Melgarejo e Aniesse Aguiar, por todos os esforços para o meu amadurecimento profissional. Agradeço também por todos os momentos agradáveis, por todos os momentos tensos e mais que tudo, por toda a orientação a mim conferida nestes últimos 15 anos juntos.

Ao meu grande orientador e amigo Giovanni, quem abriu as portas do seu laboratório quando eu nada sabia de bioquímica, contribuindo imensamente para minha formação.

À querida Lina, pela amizade, paciência, confiança e mais que tudo, pela grande contribuição técnica neste trabalho.

À minha querida orientadora Débora, pelo carinho, pela habilidade em me ajudar a superar os momentos mais tensos deste período e principalmente, por ter acreditado no meu projeto e dado todo o suporte necessário para que ele fosse realizado.

Agradeço a Unidade de Espectrometria de Massas - UFRJ, em especial para Aninha, Patrícia, Letícia e Márcia por toda ajuda no trabalho de bancada e na identificação de proteínas.

À todos do laboratório de Hemostase e venenos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

À todos do LAPA, em especial para a Carol e a Mônica, que sempre se prontificaram em ajudar nos momentos em que precisei.

Ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento pelos trabalhos lá realizados, em especial ao Saulo pelo suporte nos experimentos e a Sueli pela nossa longa amizade e companheirismo.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton pelo suporte neste trabalho

À Rede Proteômica do Rio de Janeiro

À Divisão de Zoologia Médica por todo o suporte neste trabalho.

À Divisão de Vacinas à Vírus do IVB, em especial para amiga Lilia, pela importante contribuição neste trabalho, com a produção dos soros policlonais.

À Didi, pela amizade gratuita, desde a minha chegada no laboratório e pela magnífica cromatografia realizada na minha tese.

Ao meu grandioso aluno Ricardo Teixeira por sua importante contribuição neste trabalho e pelo capricho e destreza na realização dos experimentos.

Às queridas Ana Cristina e Vilma Pereira, por tudo que me ensinaram no serpentário e por saber que sempre torceram por mim.

Ao amigo Bené pela torcida de que tudo desse certo

Aos amigos de Laboratório de Bioquímica de Proteínas e peptídeos pela amizade e ajuda que me foi dada, em especial para a Cris, o Herbert e a Lili.

À todos os meus amigos pela torcida e por entenderem a minha ausência..

E por último, mas com um enorme carinho, à todos os amigos do MPTI, por tudo que passamos juntos nesses dois anos.

Não julgues nada pela pequenez dos começos.

Uma vez fizeram-me notar que não se distinguem pelo tamanho as sementes que darão ervas anuais das que vão produzir árvores centenárias.

(Josemaría Escrivá)

ÍNDICE

ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – A SERPENTE.....	1
1.2 – O ACIDENTE BOTRÓPICO.	7
1.3 – O SORO ANTIOFÍDICO X A SORONEUTRALIZAÇÃO DO VENENO DE <i>B.</i> <i>JARARACUSSU</i>	10
1.4 – O DIAGNÓSTICO NO ACIDENTE OFÍDICO.....	14
1.5 – O DESENVOLVIMENTO DE “KITS” PARA DETECÇÃO DE VENENOS.....	17
1.6 – A PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE VENENOS ANIMAIS.	20
1.6.1 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	20
1.6.2 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	21
2 – JUSTIFICATIVA	25
3- OBJETIVOS.....	27
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 – VENENOS.....	28

4.2 – ANIMAIS	28
4.3 – AVALIAÇÃO DA DOSE LETAL 50%.....	28
4.4 – IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA OBTENÇÃO DE SOROS POLICLONAIS	29
4.5 – AVALIAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50%.....	30
4.6 – TÉCNICA DE DOT-BLOTTING	30
4.7 – TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	31
4.7.1 – SDS-PAGE	31
4.7.2 – 2D-PAGE	31
4.8 – ANÁLISE DE IMAGENS	32
4.9 – TÉCNICA DE IMUNOBLOTTING.....	33
4.10 – PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISE DO GRAU DE PUREZA	33
4.10.1 – ISOELETROFOCALIZAÇÃO	33
4.10.2 – CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	34
4.10.3 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC).....	34
4.11 – DIGESTÃO TRÍPTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	34
4.12 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS	35
4.13 – ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR BIOINFORMÁTICA	36
4.13.1 – ANÁLISE DE SIMILARIDADE	36
4.13.2 – ALINHAMENTO MÚLTIPLO	36
4.14 – CARACTERIZAÇÃO DA BJSSU-PI2,2.....	36
4.14.1 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36

4.14.2 – ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	36
4.14.3 – ESPECTROPOLARIMETRIA DE DICROISMO CIRCULAR	37
5 - RESULTADOS.....	38
5.1 – PRODUÇÃO E ANÁLISE DOS SOROS POLICLONAIS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS.....	38
5.1.1 – TITULAÇÃO DOS SOROS ESPÉCIE ESPECÍFICOS.....	38
5.1.2 – AVALIAÇÃO DA SORONEUTRALIZAÇÃO CRUZADA <i>IN VITRO</i> , DOS SOROS ESPÉCIE ESPECÍFICOS	38
5.1.3 – AVALIAÇÃO DA SORONEUTRALIZAÇÃO CRUZADA <i>IN VIVO</i> , DOS SOROS ESPÉCIE - ESPECÍFICOS	42
5.2 – DESENVOLVIMENTO DO MAPA BIDIMENSIONAL DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> E ANÁLISE DO PERFIL ANTIGÊNICO	45
5.2.1 – PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA BIDIMENSIONAL PARA O ESTUDO DO VENENO DE <i>B.</i> <i>JARARACUSSU</i>	45
5.2.2 – ANÁLISE DA ANTIGENICIDADE DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	47
5.2.3 – MAPEAMENTO DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> QUANTO À SIMILARIDADE IMUNOLÓGICA COM O VENENO DE <i>B. JARARACA</i>	51
5.3 – PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES COM POTENCIAL BIOMARCADOR DO VENENO DE <i>B.</i> <i>JARARACUSSU</i>	54
5.3.1 – FRACIONAMENTO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> POR ISOELETROFOCALIZAÇÃO E ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE POR IMUNOBLOTTING	54
5.3.2 – FRACIONAMENTO DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO.....	60
5.4 – IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADOR DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	66

5.5 – CARACTERIZAÇÃO DO BIOMARCADOR DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	71
5.5.1 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA.	71
5.5.2 – ESTRUTURA SECUNDÁRIA.	72
5.5.3 – FLUORESCÊNCIA DE TRIPTOFANO.	73
6 - DISCUSSÃO	74
7 - CONCLUSÃO	82
8 - BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FAMÍLIA, GÊNERO E ESPÉCIE DAS SERPENTES PEÇONHENTAS NO BRASIL.	03
TABELA 2:.. RESUMO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO VENENO BOTRÓPICO.	08
TABELA 3:.. PLANO DE IMUNIZAÇÃO.	29
TABELA 4:.. RESULTADO DA SORONEUTRALIZAÇÃO IN VIVO DO VENENO DE B. JARARACA FRENTE AOS SORO HOMÓLOGO E HETERÓLOGO.	43
TABELA 5:.. RESULTADO DA SORONEUTRALIZAÇÃO IN VIVO DO VENENO DE B. JARARACUSSU FRENTE AOS SORO HOMÓLOGO E HETERÓLOGO.	43
TABELA 6:.. Análise de Similaridade do peptídeo RSVANDDEVIR	67
TABELA 7:.. Análise de Similaridade do peptídeo RKPALYTKV	67
TABELA 8:.. Análise de Similaridade do peptídeo RFLVALYTSRS.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO DOS ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL (1990 – 1993).....	02
FIGURA 2: BORHROPS JARARACUSSU E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO BRASIL.....	04
FIGURA 3: EVOLUÇÃO DO APARELHO VENENOSO EM SERPENTES	05
FIGURA 4: O CASO “SEU JOSÉ”.	09
FIGURA 5: INTERAÇÃO ENTE ANTÍGENO E ANTICORPO.	14
FIGURA 6: ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS DUAS ETAPAS DA 2D-PAGE.	21
FIGURA 7: PRINCÍPIO DO MALDI-TOF	23
FIGURA 8: PRINCÍPIO DO Q-TOF.....	24
FIGURA 9: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS VENENOS DE <i>B. JARARACUSSU</i> E <i>B. JARARACA</i>	40
FIGURA 10: IMUNOBLOTTING DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	41
FIGURA 11: 2D-PAGE DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> E <i>B. JARARACA</i>	46
FIGURA 12: 2D-PAGE DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> PH 3-10 COM DTT	49
FIGURA 13: IMUNOBLOTTING DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	50
FIGURA 14: MAPA DE SIMILARIDADE IMUNOLÓGICA DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	53

FIGURA 15: FRACIONAMENTO DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> POR ISOELETROFOCALIZAÇÃO	55
FIGURA 16: ANÁLISE POR GEL FILTRAÇÃO DA PUREZA DA BJSSU-PI 2,2	56
FIGURA 17: IMUNOBLOTTING DAS FRAÇÕES DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	58
FIGURA 18: IMUNOBLOTTING DA PROTEÍNA BJSSU-PI2,2.	59
FIGURA 19: FRACIONAMENTO DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i> POR GEL FILTRAÇÃO.....	62
FIGURA 20: IMUNOBLOTTING FRAÇÕES DE ALTO PESO <i>B. JARARACUSSU</i>	63
FIGURA 21: 2D-PAGE FRAÇÕES DE ALTO PESO PH 3-10 SEM DTT	64
FIGURA 22: 2D – IMUNOBLOTTING DAS FRAÇÕES DE ALTO PESO DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	65
FIGURA 23: IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SELECIONADAS DO VENENO DE <i>B. JARARACUSSU</i>	69
FIGURA 24: ALINHAMENTO DAS CINCO PROTEÍNAS QUE APRESENTARAM MAIOR HOMOLOGIA COM OS PEPTÍDEOS SEQÜENCIADOS NO Q-TOF.....	70
FIGURA 25: ATIVIDADE AMIDOLÍTICA (BAPNA) DA PROTEÍNA BJSSU-PI2,2.....	71
FIGURA 26: ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA BJSSU-PI2,2.	72
FIGURA 27: ANÁLISE DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DA BJSSU-PI2,2	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA	α - <i>N</i> -benzoil-dl-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
BthTX-I	Bothropstoxina-I
CD	Dicroísmo Circular
CDR	Regiões Determinantes de Complementaridade
CSL	Commonwealth Serum Laboratories
Da	Daltons
DTT	Dithiothreitol
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
2D-PAGE	Eletroforese Bidimensional em gel de poliacrilamida.
ELIZA	“Enzyme Linked imunoassay” Ensaio enzimático de imunoaderência ligado à enzima
ESI	“Eletrospray ionization”
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HPLC	do inglês “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ” (Cromatografia Líquida de alta resolução)
IB	Instituto Butantan
IVB	Instituto Vital Brazil
kDa	Kilodaltons
MALDI	“Matrix Assisted Laser Dessorption Ionization” ionização a laser assistida por matriz

NCBI	Centro Nacional de Informação para Biotecnologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
pI	Ponto Isoelétrico
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMF	Do inglês “Peptide-mass fingerprint” Impressão Digital da Proteína
PVDF	Polyvinilpyridine
Q/TOF	Analísadores associados (tandem) do tipo quadrupolo e tempo de voo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBS	Tris 20mM pH 7,5 contendo NaCl 0,5M
TOF	Analísador do tipo tempo de voo
TTBS	Tris 20mM pH7,5 contendo NaCl 0,5M e 0,05% Tween 20
VDK	do inglês “Kit” de detecção de veneno

RESUMO

Os animais peçonhentos são aqueles capazes de produzir e inocular veneno (peçonha) em suas vítimas. No Brasil, foram catalogadas, até o momento, 326 espécies de serpentes, dentre as quais cerca de 50 são peçonhentas e de grande interesse para a Saúde Pública. A *Bothrops jararacussu* é a espécie brasileira que possui a capacidade de produzir e inocular a maior quantidade de veneno. Nos acidentes ofídicos causados por esta espécie, a ação do veneno não é totalmente neutralizada pelo soro específico, o antibotrópico, sendo importante nestes casos a adoção de uma conduta terapêutica diferenciada através da administração do soro poliespecífico, o antibotrópico-crotálico. No entanto, considerando-se apenas os sintomas clínicos do paciente, o médico não tem como discriminar se o acidente foi provocado por *B. jararacussu* ou por outra espécie do gênero. Vale ainda ressaltar que para as demais espécies do gênero *Bothrops*, o soro antibotrópico é o mais indicado, fato que impossibilita o médico de adotar como estratégia geral, a utilização do soro antibotrópico-crotálico como uma terapêutica única no acidente botrópico. Esta tese teve como objetivo a caracterização, através de técnicas de imun química, do veneno de *B. jararacussu* e a identificação de possíveis biomarcadores para este veneno. Para a triagem dos biomarcadores foram produzidos soros espécie-específicos para os venenos de *B. jararacussu* (soro anti-jararacussu) e para *B. jararaca* (soro anti-jararaca). Nas análises por “imunoblotting” a partir do fracionamento por 2D-PAGE foi visto um bom reconhecimento por ambos os soros, principalmente das frações de alto peso do veneno de *B. jararacussu*, mostrando que estas frações são as mais imunogênicas neste veneno. A partir destes dados, foram identificadas no mapa bidimensional, as principais proteínas de baixa imunogenicidade deste veneno. Uma proteína de 60kDa e pl ácido foi identificada como uma serino proteinase. Esta identificação foi obtida a partir da homologia com uma protease com domínio tripsina, denominada BOTIN, presente no banco de dados de ESTs de *B. insularis*. Esta proteína de pl ácido (denominada Bjssu-pl2,2) foi, pela primeira vez, descrita nesta espécie. Na região básica, foram identificadas duas outras proteínas, as quais demonstraram um baixo reconhecimento tanto pelo soro homólogo (soro anti-jararacussu) como pelo heterólogo (soro anti-jararaca). A proteína de 29kDa foi identificada como uma serino proteinase da família S1 e a de 16kDa foi identificada como Botropstoxina-I (BthTX-I), a principal miotoxina do veneno de *B. jararacussu*. Desta forma, a abordagem desta tese através de técnicas como eletroforese bidimensional somado a técnicas sensíveis como “imunoblotting” e espectrometria de massas, se mostrou muito interessante para o estudo imun químico das frações do veneno de *B. jararacussu*. As diferenças no reconhecimento dos soros espécie-específicos frente ao veneno de *B. jararacussu* permitiram a identificação de três proteínas com potencial para serem utilizadas como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico diferencial para esta espécie. Além disso, os resultados deste trabalho reforçam a questão da ineficiência do soro antibotrópico para a neutralização do veneno no acidente causado por esta espécie, podendo se relacionar a importância da fração crotálica para a neutralização de toxinas pouco imunogênicas do veneno de *B. jararacussu*, como é o caso da BthTX-I.

ABSTRACT

Poisonous animals are characterized by the ability to produce and inject venom (poison) in their victims. Until nowadays there are 326 different species of snakes catalogued in Brazil and, among them 50 species are venomous and important regarding public health. The *Bothrops jararacussu* is the Brazilian specie that has the ability to produce and inoculates higher amounts of venom. In the reported cases concerning this specie, the action of this venom can not be efficiently neutralized with specific antivenin, the antitropic serum. In such cases, the attendant must adopt a differentiated therapeutic conduct that consists in the administration of the antitropic – crotalic serum. However, in considering just the clinical symptoms of the patient, the doctor is not able to distinguish if the accident was caused by *B. jararacussu* or another specimen from *Bothrops* genus. It is important to emphasize the fact that for other specimens from *Bothrops* genus, the antitropic serum is the most indicated treatment and for this reason, it is inadequate for the doctor adopt antitropic – crotalic serum as a single therapeutic strategy. In this study we aimed to characterize specific biomarkers present in the venom of *B. jararacussu* through the use 2D-PAGE combined with immunoblotting. To achieve this goal, we produced sera anti-jararacussu and anti-jararaca and cross-reacted this sera against their specific venom as well against each other. 2D-gel analyses revealed that the high-molecular-weight fractions of both venoms were well recognized by each specific anti-sera as well as by the non-specific one. This suggests that the proteins present in the high-molecular-weight fraction of each venom are the most immunogenic. Also, the 2D PAGE allowed us to identify the less immunogenic proteins in these venoms. Among them is a 60 kDa acid protein identified as a serine protease due to its high homology with a protease called BOTIN that possess a trypsin domain present in ESTs data bank from *B. insularis*. This acidic protein characterized in this work was called Bjsu-pl2,2 and was for the first time described in this specie. The other proteins displaying low immunogenic properties were a 29 kDa protein identified as a serine protease from S1-family and a 16 kDa protein identified as a Bothropstoxin-I (BthTX-I), the major myotoxin from *B. jararacussu* venom. Thus, the approach used in this thesis, based on bidimensional electrophoresis in combination with sensitive techniques such as immunoblotting and mass spectrometry, showed to be interesting for the immunochemistry study of the *B. jararacussu* venom proteins. The three proteins here identified in the venom of *B. jararacussu* present a potential use as biomarkers. Moreover, this study also shed light into the reasons why the anti-bothropic serum is so ineffective against the *B.jararacussu* venom reinforcing the role of the anti-crotalic serum in neutralizing low immunogenic proteins from the *B. jararacussu* venom, such as the BthTX-I.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A SERPENTE

Os animais peçonhentos são aqueles capazes de produzir e inocular veneno (peçonha) em suas vítimas. No Brasil existem diferentes gêneros e espécies de animais peçonhentos, como serpentes dos gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, e *Lachesis* da família *Viperidae*, *Micrurus* (família *Elapidae*) (Melgarejo, 2003); escorpiões do gênero *Tityus*, aranhas dos gêneros *Ladrodectus*, *Loxosceles* e *Phoneutria* e abelhas do gênero *Apis*. Todos são comumente encontrados nas diferentes regiões do Brasil, porém, as serpentes, se destacam pela frequência e gravidade dos acidentes que produzem (Cardoso *et al*, 2003).

No Brasil foram catalogadas até hoje 326 espécies de serpentes (SBH, 2007), das quais cerca de 50 são peçonhentas e despertam interesse na Saúde Pública. As serpentes pertencentes à subfamília *Crotalinae* são responsáveis 99,5% dos acidentes ofídicos, que envolve os mais graves (Tabela 1). Entre essa rica fauna herpetológica, o gênero *Bothrops* possui as espécies de maior importância médica, já que são as responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos no Brasil (Figura 1). Em particular a “jararacuçu” (*Bothrops jararacussu*) merece uma grande atenção, pois é uma serpente que pode atingir 2 m de comprimento e que habita desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio Grande do Sul, estendendo-se ao Paraguai e ao extremo norte da Argentina (Figura 2). A sua cabeça é desproporcionalmente grande, principalmente por causa das avantajadas glândulas de veneno e por apresentar um aparelho inoculador de veneno muito desenvolvido (solenóglifos¹) (Figura 3). De acordo com a dentição, as serpentes solenóglifas são as mais especializadas em envenenar suas presas, já que possuem presas inoculadoras de veneno que se assemelham com uma agulha de injeção. No momento da picada, as presas se movem para frente, facilitando a sua invasão

¹ De acordo com a morfologia da dentição, as serpentes podem ser divididas em áglifas, opistóglifas, proteróglifas e solenóglifas, vide Figura 2, página 5.

nos tecidos e canalizando o veneno para o interior da presa. Na espécie *B. jararacussu*, estas presas podem medir até mais de 2,5 cm.

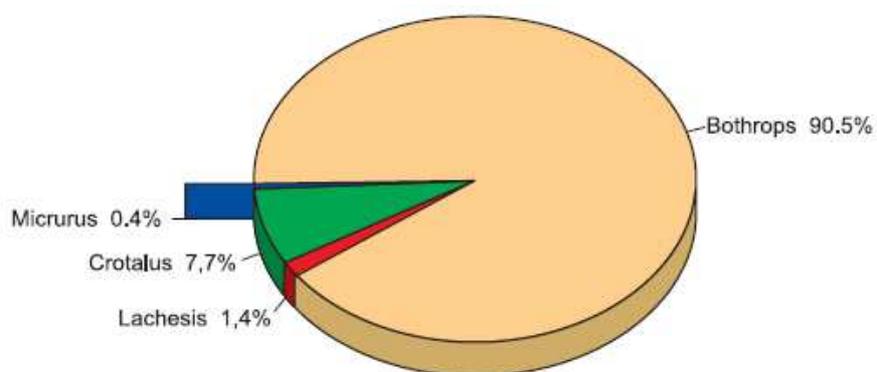


Figura 1 - Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil (1990 – 1993), segundo o gênero da serpente causadora do acidente. FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001

Tabela 1: Família, Gênero e espécie das serpentes peçonhentas no Brasil.
 Na coluna das espécies esta destacado a *B. jararacussu*, serpente alvo deste estudo
 (Adaptado Melgarejo, 2003)

SERPENTES PEÇONHENTAS DO BRASIL			
FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE	
VIPERÍDEOS	Gênero Bothriopsis	<i>bilineata bilineata</i> " <i>smaragdina</i> <i>taeniata</i>	
	Gênero Bothrocophias	<i>hyoprora</i> <i>microphthalmus</i>	
	Gênero Bothrops	<i>alcatraz</i> <i>alternatus</i> <i>atrox</i> <i>brazili</i> <i>cotiara</i> <i>diporus</i> <i>erythromelas</i> <i>fonsecai</i> <i>insularis</i> <i>itapetiningae</i> <i>jararaca</i> <i>jararacussu</i>	<i>leucurus</i> <i>lutzi</i> <i>marajoensis</i> <i>mattogrossensis</i> <i>moojeni</i> <i>muriciensis</i> <i>neuwiedi</i> <i>pauloensis</i> <i>pirajai</i> <i>pradoi</i> <i>pubescens</i> sp
	Gênero Crotalus	<i>durissus cascavella</i> " <i>collilineatus</i> " <i>marajoensis</i>	<i>durissus ruruima</i> " <i>terrificus</i>
	Gênero Lachesis	<i>muta muta</i> " <i>rhombeata</i>	
	ELAPÍDEOS	Micrurus	<i>albicinctus</i> <i>altirostris</i> <i>averyi</i> <i>brasiliensis</i> <i>corallinus</i> <i>decoratus</i> <i>filiformis</i> <i>frontalis</i> <i>hemprichii</i> <i>ibiboboca</i>
Leptomicrurus		<i>collaris</i> <i>narduccii</i> <i>scutiventris</i>	

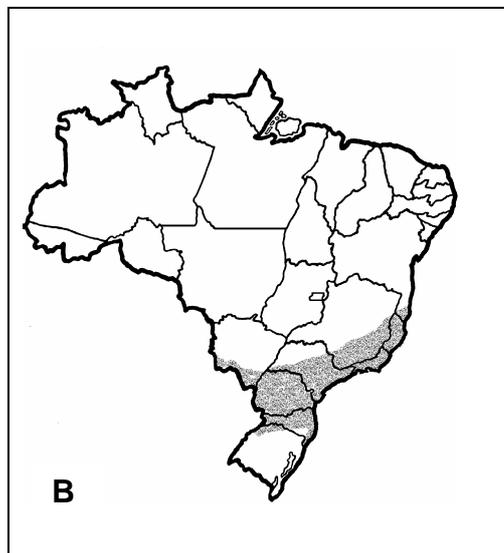


Figura 2: *Borhrops jararacussu* e sua distribuição geográfica no Brasil
Em A, uma fêmea de *B. jararacussu* no momento da alimentação. Em B, distribuição geográfica desta espécie no Brasil baseado nos dados do Ministério da Saúde. (Foto e Figura: Anibal Melgarejo, reproduzida com autorização)

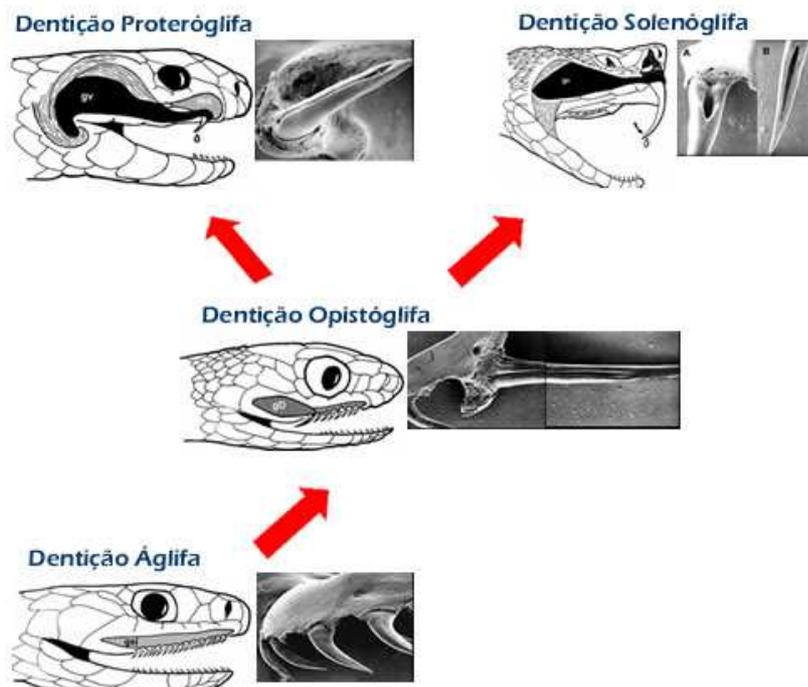


Figura 3: Evolução do aparelho venenoso em serpentes.

A dentição áglifa e opistóglifa são características de serpentes não venenosas. A dentição proteróglifa é encontrada em espécies da família Elapidae (gênero *Micrurus* no Brasil) e o tipo de dentição solenóglifa é característica de serpentes da subfamília Crotalinae, gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (*Surucucus*) no Brasil. (Figura: Aníbal Melgarejo, reproduzida com autorização).

MELGAREJO (2003) ressalta que a *B. jararacussu* é a espécie brasileira que produz e pode inocular maior quantidade de veneno. Belluomini 1964, relatou a obtenção de uma média de 400 mg de veneno seco (cerca de 2 mL) por extração, com máximo de 830 mg. No Instituto Vital Brazil (IVB), situado na cidade de Niterói-RJ, já foi extraído, em uma única etapa, 6.8 mL de veneno (1.670 mg de veneno liofilizado) de uma fêmea desta espécie, que media 1,76 m de comprimento (Melgarejo *op. cit.*). Esta quantidade de veneno representa cerca de 25 vezes mais do que a média de veneno extraída de uma jararaca (*Bothrops jararaca*) também no IVB.

Nos últimos anos vem sendo registrado um aumento significativo do número de exemplares de jararacuçu recebidos no IVB. Vinte anos atrás era registrada a chegada de um espécime de *B. jararacussu* para cada cinqüenta de *B. jararaca* recebidas no serpentário deste Instituto e atualmente, essa proporção mudou para um exemplar de *B. jararacussu* para cada cinco de *B.*

jararaca. Vale ressaltar, que a média do número de jararacas recebidas no serpentário permaneceu basicamente a mesma, o que indica, nitidamente, o crescimento do número de exemplares de *B. jararacussu* recebidos no IVB. Ainda não está clara a explicação biológica para tal mudança. Esta, tanto pode estar relacionada simplesmente ao crescimento dessa espécie em resposta a mudanças ambientais, principalmente devido ao crescimento urbano desordenado e não acompanhado da infra-estrutura necessária em áreas florestais de ocorrência desta espécie, como apenas pela invasão do homem em seu hábitat natural e conseqüentemente um maior contato da população com essa espécie. As referidas hipóteses merecem especial atenção, devido às conseqüências do acidente causado por esta espécie para a saúde pública. É fato que, levando-se em conta apenas a quantidade de veneno produzida pelas serpentes aqui citadas, os acidentes causados por *B. jararacussu* serão sempre muito mais graves que os causados por *B. jararaca*.

Um outro ponto importante a respeito da biologia da *B. jararacussu* está relacionado à dieta desta espécie. Diferente de outras espécies do gênero, a jararacuçu apresenta uma dieta diversificada que compreende pequenos mamíferos, anfíbios, lagartos, marsupiais, entre outros (Amaral, 1927; Marques et al, 2001; Correa-Netto et al, 2002). Essa diversidade alimentar não está simplesmente relacionada a mudanças ontogenéticas, visto que na fase adulta, esta serpente se alimenta tanto de mamíferos, de anfíbios, como de marsupiais. Este fato parece estar muito mais relacionado a mudanças sazonais, ou simplesmente a disponibilidade de alimento em uma determinada região, para esta espécie. Esta questão biológica se faz importante, no contexto desta espécie para a saúde pública, visto que há uma relação direta da composição bioquímica do veneno com a dieta do animal e sendo assim, uma serpente que necessita comer animais fisiologicamente distintos, como é o caso da *B. jararacussu*, necessitaria ter um veneno que apresentasse toxicidade alta para os diferentes sistemas biológicos. Destaca-se o fato de que muitos marsupiais, mais especificamente o gambá (*Didelphis marsupialis*), apresentam resistência contra diferentes venenos de serpentes (Moussatché et al, 1989). Porém, no IVB foi registrado a chegada de uma jararacuçu fêmea, de aproximadamente 1,8 m, portando um exemplar de gambá em seu estômago

(dados não publicados). Este fato é muito interessante, já que pode estar relacionado com o porquê de esta espécie produzir tanto veneno, como também ao fato deste veneno apresentar características imunológicas incomuns ao gênero.

1.2 - O ACIDENTE BOTRÓPICO

No Brasil ocorrem cerca de 20.000 acidentes ofídicos a cada ano (Ministério da Saúde, 2001). Os acidentes botrópicos (causados por espécies do gênero *Bothrops*) são responsáveis por cerca de 90% dos casos reportados, como pode ser visto na Figura 3. No Rio de Janeiro, a sua relevância é ainda maior, próxima a 98% de cerca dos 1000 casos anuais, estando principalmente relacionado ao fato destas serpentes habitarem tanto áreas rurais, com proliferação de roedores, como pequenas inclusões de mata, nas grandes cidades deste Estado. Com referência ao acidente causado por *B. jararacussu*, vale ressaltar que não há estudos epidemiológicos mostrando o número e acidentes causados por esta espécie no Rio de Janeiro.

O veneno botrópico contém muitos peptídeos e proteínas com atividade biológica local e sistêmica. A função de cada um desses componentes, bem como suas interações no envenenamento, ainda não estão totalmente esclarecidas (Warrel et al, 1989). No entanto, as fisiopatologias deste envenenamento já são bem conhecidas (França & Málaque, 2003). No envenenamento botrópico são descritas três atividades; proteolítica ou inflamatória local aguda; coagulante e hemorrágica (Rosenfeld, 1971). A atividade proteolítica é causada por um conjunto de toxinas do veneno, bioquimicamente heterogêneas, onde as mais importantes são: aminas biogênicas do tipo histamina, peptídeos potenciadores de bradicinina, fosfolipase A₂, esterases, cininogenases, entre outras (Iwaanaga & Suzuki, 1979). Tais toxinas induzem a liberação de várias substâncias com atividade inflamatória. Já a atividade sobre a coagulação é resultado da ação de toxinas do veneno capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fatores da coagulação, ocasionando um consumo de fibrinogênio do paciente e formação de fibrina intravascular. A atividade hemorrágica é resultado da ação de hemorraginas (metalo proteinases) que rompem o endotélio vascular (degradando

componentes da matriz extracelular) e atuam como desintegrinas. As atividades aqui citadas são bastante complexas e podem ser atribuídas tanto a uma determinada molécula, especificamente, ou a um efeito sinérgico entre diferentes proteínas do veneno. De forma resumida, a Tabela 2 apresenta os principais componentes protéicos, peptídicos e não-protéicos do veneno botrópico.

Tabela 2: Resumo da composição Bioquímica do veneno Botrópico. Principais frações protéicas, não-protéicas e peptídicas identificado no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, com base em (Iwaanaga & Suzuki, 1979; Markland, 1998)

Principais Componentes bioativos do Veneno Botrópico							
Protéicos	Enzimáticos	Não Enzimáticos	Peptídicos	Desintegrinas	Não-Protéicos	Orgânicos	Inorgânicos
	Fosfolipases	Lectinas		Neurotóxico		Aminas biogênicas	Cálcio
	Fosfoesterases	Ativadores de Proteína C		Citotóxico		Carboidratos	Cobre
	L-aminoácido oxidase	Fatores de Crescimento de Nervos		Miotóxico		Aminoácidos	Ferro
	Acetilcolinesterase	Precusores de peptídeos bioativos		Potenciadores de Bradicinina		Citratos	Potássio
	Serinoproteases			Natriuréticos		Nucleotídeos	Magnésio
	Metaloproteases			Cardiotóxico			Manganês
	Hialuronidases						Sódio
	Catalases						Fósforo
	Aminotransferases						Cobalto
	Cininogenases						Zinco
	Ativadores de fator X						

Os venenos de serpentes pertencentes a um mesmo gênero apresentam atividades tóxicas similares, porém perfis eletroforéticos diferentes (Moura-da-Silva, et al, 1991). No entanto, dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, o veneno de *B. jararacussu* é peculiar por apresentar características incomuns ao do gênero. Uma intensa atividade miotóxica é característica desse veneno, fruto principalmente da atividade da Bothropstoxina I, uma Lys-49 fosfolipase A₂ (PLA₂) – símile composta por uma cadeia polipeptídica de 121 resíduos de aminoácidos e peso molecular aproximado de 13.720 Da. (Cintra et al., 1993). Esta é uma das proteínas majoritárias desse veneno e a principal responsável pela evolução do quadro clínico relacionados a complicações locais do tipo necrose. Estes efeitos podem comprometer tecidos subcutâneos, ou estruturas mais profundas como músculo e tendões, eventualmente evoluindo para um

quadro onde seja necessária a amputação do membro afetado. Embora o óbito seja a consequência mais temida e combatida no acidente ofídico, a amputação de extremidades, o déficit funcional e o comprometimento renal, podem ocorrer com maior frequência e são também eventos bastante lamentáveis (França & Málaque, 2003) levando a morbidade dos indivíduos atingidos (Figura 4).



Figura 4: O Caso “Seu José”.

Um caso confirmado de acidente causado por *B. jararacussu* em que o paciente perdeu 1/3 da mão esquerda, aos 20 anos de idade. (Foto Aníbal Melgarejo, reprodução autorizada).

Nesse panorama, destaca-se o envenenamento causado pela espécie *B. jararacussu*, que embora não esteja bem quantificado, é um acidente que merece especial atenção, principalmente pela gravidade dos seus efeitos patológicos, nem sempre bem neutralizados pelo soro específico (Antibotrópico²); e pelo fato de ser uma espécie cada vez mais presente em áreas urbanas do Estado do Rio de Janeiro, onde tradicionalmente não seria

esperado acidentes ofídicos graves.

1.3 - O SORO ANTIOFÍDICO X A SORONEUTRALIZAÇÃO DO VENENO DE *B. JARARACUSSU*.

A soroterapia antiofídica foi descoberta simultaneamente por Calmette e Phisalix & Bertrand. Os dois grupos divulgaram seus resultados mostrando a proteção de anti-soros contra o veneno de Naja, no encontro da Sociedade Francesa de Biologia em 10 de fevereiro de 1894 (Calmette, 1894; Phisalix & Bertrand, 1984). Em 1903, Vital Brazil preparava os primeiros soros antiofídicos do Brasil. Foram inicialmente preparados soros contra o veneno de *Lachesis lanceolatus* (hoje classificada como *Bothrops jararaca*) e contra o veneno de *Crotalus terrificus* (hoje classificada como *Crotalus durissus*). Experimentalmente, Vital Brazil mostrou que o soro anti-naja de Calmette era ineficaz no tratamento de serpentes brasileiras, tendo sido o primeiro a defender a idéia da especificidade da ação dos antivenenos, o que contrariava a teoria original de Calmette (Hawgood, 1992).

A soroterapia é considerada, até hoje, o único tratamento seguro e específico para o envenenamento ofídico, aceito pela OMS (World Health Organization, 1981).

Os soros hiperimunes são produzidos a partir de plasma de eqüinos imunizados com um pool de veneno bruto na presença de adjuvantes. Atualmente, são produzidos soros mono e poliespecíficos pelos três produtores oficiais do Brasil: Instituto Vital Brazil (IVB), Instituto Butantan (IB) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Um soro monoespecífico é aquele produzido a partir de plasma de eqüinos imunizados com veneno de serpentes do mesmo gênero. Como exemplo de soro monoespecífico pode-se citar o antibotrópico, específico para os acidentes causados pelas diferentes espécies do gênero *Bothrops* (jararacas); o anticrotálico para as diferentes espécies do gênero *Crotalus* (cascavéis). Um soro poliespecífico é aquele capaz de neutralizar o envenenamento causado por serpentes de diferentes gêneros. Podem ser

² O soro antibotrópico é específico para o acidente causado por serpentes do gênero *Bothrops* e é produzido a partir de um pool constituído de veneno proveniente de 5 espécies (*B. jararaca*, *B.*

produzidos seguindo basicamente dois protocolos distintos de imunização: o primeiro, utilizando-se os venenos dos diferentes gêneros juntos, em todo processo de imunização da tropa de eqüinos e a partir desse plasma é que se inicia o processo de fabricação do soro; e o segundo, imunizando cada tropa com venenos de um mesmo gênero, separadamente e, apenas no final do processo de fabricação, os diferentes soros conferindo proteção para os diferentes gêneros são misturados. Como exemplo de soros poliespecíficos usualmente produzidos, podemos citar o antibotrópico – crotálico (com capacidade de neutralizar o veneno de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus) e o antibotrópico – laquélico (com capacidade de neutralizar o veneno de serpentes dos gêneros Bothrops e Lachesis).

A escolha da soroterapia específica é realizada pelo médico com base no diagnóstico, levando-se em conta os sinais e sintomas clínicos que o paciente apresenta no momento do atendimento e, quando possível, a identificação do animal agressor. Quando o diagnóstico é feito sem deixar qualquer dúvida, ele é chamado de “Diagnóstico de certeza”. O diagnóstico de certeza é feito, quando a serpente é capturada e trazida para identificação por pessoal especializado; e o paciente apresenta sinais evidentes da picada, acompanhados ou não de manifestações locais e ou sistêmicas, compatíveis com um acidente ofídico (Ministério da Saúde, 1991). Os diagnósticos de certeza são raros, uma vez que dificilmente o paciente leva o animal consigo para identificação e pelo fato que a maioria dos hospitais não apresenta em seu quadro funcional, um profissional especializado para realizar tal identificação.

Dentro da problemática na identificação do acidente ofídico e a escolha da soroterapia correta para cada tipo de acidente é que surgem questões sobre o acidente causado pela espécie *B. jararacussu* no âmbito da Saúde Pública.

Os pontos nevrálgicos do acidente causado pela jararacuçu podem ser resumidos, destacando-se três fatores que chamam a atenção para a referida espécie: 1 - seu aparente crescimento registrado atualmente no IVB, principalmente em áreas densamente povoadas, em regiões metropolitanas do

jararacussu, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* e *B. moojeni*)

Rio de Janeiro; 2 - o alto potencial de inocular quantidades letais de veneno; 3 - a aparente baixa eficiência na neutralização deste veneno pelo soro específico, o antibotrópico. Dentro destes pontos, o último é o que chama especial atenção, visto que as questões da baixa eficiência na neutralização deste veneno agravam os problemas relacionados aos pontos anteriores, ou seja, a questões referentes à biologia desta espécie.

Questões sobre a soroneutralização do envenenamento causado pela jararacuçu vêm sendo discutidas desde longa data. Em 1911, Vital Brazil relata: “... o veneno da jararacuçu não se filia inteiramente, nem ao tipo botrópico, nem ao tipo crotálico, participando por algumas de suas propriedades destes dois tipos de peçonha. Nem o soro anticrotálico, nem o antibotrópico são suficientemente ativos contra este veneno. Nos acidentes determinados pela jararacuçu deverá ser sempre preferido o soro antiofídico” Como pode ser visto, Vital Brazil foi o primeiro a chamar atenção para a peculiaridade do veneno de *B. jararacussu* e sugeriu o uso de uma mistura em partes iguais dos soros antibotrópico e anticrotálico (antigo soro antiofídico) para tratar esse acidente (Brazil, 1911). Após as referidas observações de Vital Brazil sobre a o tratamento do acidente causado pela espécie *B. jararacussu*, novos estudos sobre este assunto, somente foram retomados no final da década de 80, quando Dias da Silva *et al.*, 1989 observaram que este veneno era pouco imunogênico, comparado com o veneno das outras serpentes do gênero Bothrops e também que a atividade letal deste veneno era insuficientemente neutralizada tanto pelo soro espécie-específico anti-*B. jararacussu*, como o antibotrópico comercial. Em 1990a, Moura da Silva *et al.*, faz referência ao veneno da *B. jararacussu* como sendo pouco imunogênico e o soro espécie-específico anti-*B. jararacussu* apresentava baixa reatividade cruzada frente a outros venenos botrópicos. Em 1992, Dos Santos *et al.*, com referência à soroneutralização do veneno de *B. jararacussu*, observaram que os soros antibotrópico e anticrotálico, quando associados, mostraram um efeito neutralizante três vezes mais eficiente frente à atividade miotóxica e duas vezes mais potente contra a atividade coagulante e efeito letal, comparado quando usado apenas o soro monoespecífico, o antibotrópico. Em 1998 De Roodt *et al.*, mostraram por Western blots, que diversas proteínas de variados

venenos botrópicos, principalmente o de *B. jararacussu*, eram bem evidenciados na reação com soro antibotrópico-crotálico, não aparecendo ou se revelando de forma tênue quando usado somente o soro antibotrópico. Um efeito associativo na neutralização do veneno de *B. jararacussu*, quando utilizado os soros antibotrópico e anticrotálico também foi observado em análises imunoeletroforéticas dos soros produzidos no Instituto Vital Brazil. Estudos mais recentes também mostraram que dentro do gênero *Bothrops*, os efeitos neurotóxico e principalmente o miotóxico, somente do veneno de *B. jararacussu*, não foram completamente neutralizados pelo soro antibotrópico (Zamunér et al., 2004).

Pelos dados mencionados no parágrafo anterior, fica clara a existência de similaridade estrutural entre toxinas do veneno de *B. jararacussu* e de espécies do gênero *Crotalus*, visto que o soro anticrotálico contribui para a neutralização da toxicidade deste veneno. Porém, também fica nítido que apesar da similaridade entre tais toxinas, às presentes no veneno de *B. jararacussu* parecem ser menos imunogênicas, ou não imunogênicas, comparadas com as do veneno crotálico. Dentro desta questão, outros autores também avaliaram a neutralização deste veneno e da *Bothropstoxina-I*, só que agora utilizando-se um anti-soro produzido contra a *crotoxina*, uma fosfolipase A_2 purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Os autores observam que o referido anti-soro foi capaz de neutralizar os efeitos neurotóxicos e miotóxicos, tanto da *Bothropstoxina-I*, como do veneno total de *B. jararacussu* (Oshima-Franco et al., 2001; Beghini et al., 2005), o que demonstra a similaridade entre as referidas toxinas e a característica de bom imunógeno da *Crotoxina*.

Os epítomos são regiões de um antígeno onde ocorre ligação com o anticorpo. Nos anticorpos há regiões específicas de ligação com os epítomos, denominadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs). As CDRs são específicas e complementares para os epítomos, sendo que sua formação pode estar relacionada diretamente à estrutura primária da proteína, ou seja, por resíduos de aminoácidos consecutivos (epítomos lineares), como também podem estar relacionados a resíduos de aminoácidos que não estão

em seqüência, porém tornam-se espacialmente justapostos na proteína enovelada (epítomos conformacionais) (Abbas, 2002) (Figura 5). Ainda com referencia a reação cruzada do soro anti-crotoxina frente a bothropstoxina-I descrita acima, um estudo com o objetivo de se conhecer melhor o perfil imunológico das principais proteínas do veneno de *B. jararacussu*, como também, identificar os principais epítomos responsáveis pela reação cruzada aqui mencionada, forneceria informações importantes com potencial de aplicação na produção de soros antiofídicos.

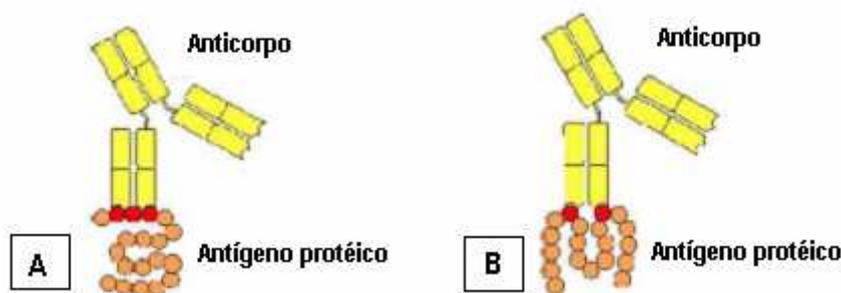


Figura 5: Interação ente Antígeno e Anticorpo

Esquema ilustrando a ligação da CRD de um anticorpo em (A) uma seqüência consecutiva de aminoácidos (epítomo linear) e em (B) resíduos de aminoácidos espacialmente justapostos (epítomo conformacional).

1.4 - O DIAGNÓSTICO NO ACIDENTE OFÍDICO

Como já foi visto no tópico de “A serpente”, o Brasil conta com um repertório bastante diverso de animais peçonhentos, fato este que contribui muito para dificultar a identificação dos acidentes ofídicos. Como reflexo dessa diversidade de animais peçonhentos, surgem problemas clássicos, como o visto na região Norte, em que a diferenciação dos acidentes causados por *Bothrops atrox* e *Lachesis muta* é um grande problema para o tratamento do acidente ofídico daquela região (Colombini, 2003). O diagnóstico diferencial entre estas duas espécies, com base nos sintomas do paciente é muito difícil e o soro antiofídico não neutraliza bem a toxicidade do veneno laquétrico (Bolanõs et al., 1982). Outro acidente, que pode levar o médico a um

diagnóstico duvidoso são os provocados por serpentes não venenosas do gênero *Phylodrias*. Os efeitos no local da picada produzido pela toxicidade da saliva destas espécies, apresentam muita similaridade com a ação local do veneno botrópico e, conseqüentemente, pode induzir a um diagnóstico errôneo, levando o paciente a um tratamento soroterápico desnecessário. Como visto nos tópicos anteriores, o acidente causado pela espécie *B. jararacussu*, apesar de merecer uma conduta terapêutica diferenciada, esbarra na dificuldade de se diagnosticar este acidente, devido à similaridade do quadro clínico de envenenamento causado por esta espécie e as outras espécies do gênero.

Além dos problemas de diagnóstico duvidoso entre espécies diferentes que provocam acidentes com sinais e sintomas clínicos similares, outro ponto importante, que também chama atenção, está relacionado à variabilidade individual da composição bioquímica dos venenos ofídicos. É visto em veneno de serpente, que a composição bioquímica e a antigenicidade podem variar entre os gêneros, entre as espécies e até mesmo entre indivíduos de mesma espécie, dependendo da idade (variação ontogenética), sexo e distribuição geográfica (Moura-da-Silva et al., 1990b, 1991, Gutiérrez et al., 1990, Lopez-Lozano et al., 2002). Assim, tais variações podem levar o acidentado a apresentar sintomas clínicos incomuns ao acidente e levar a um diagnóstico duvidoso, até mesmo em médicos bem treinados e familiarizados com o ofidismo.

Como pode ser visto, a utilização de “kits” de diagnóstico³ que propiciasse ao clínico um diagnóstico mais preciso, contribuiria muito para a qualidade no atendimento médico de acidentes com animais peçonhentos. Vale ressaltar que, desde 1903, quando no Brasil se iniciava a fabricação das primeiras ampolas de soro antiofídico (Brazil, 1903), até os dias atuais, o médico não conta com outra ferramenta, que não seja sua avaliação clínica, para diagnosticar qual o gênero do animal que provocou o acidente, antes de indicar o tratamento específico. Essa tarefa se torna cada vez mais difícil ou até impossível, quando se esbarra nos problemas aqui citados.

Outra importante aplicação dos “Kits” de detecção de veneno, no âmbito da Saúde Pública, é sua utilização no levantamento epidemiológico dos acidentes ofídicos. Na Nigéria foi feito um estudo de campo utilizando-se um teste de ELISA⁴ para detectar, tanto o veneno das serpentes daquela região, como também anticorpos produzidos contra os referidos venenos nos pacientes picados por estas serpentes. O estudo constatou que o número de acidentes ofídicos naquela região era muito maior que o esperado, confirmou a importância médica de algumas espécies e, como aplicação mais importante deste estudo, mostrou que o número de acidentes causados por algumas espécies, que a priori, não tinham importância médica, ocorria com uma frequência muito maior que a esperada e, por esse motivo, tais espécies mereciam especial atenção (Theakston & Pugh, 1981). No Brasil, até o momento, não foram feitos estudos de campo similares a esse. Com isso, o Ministério da Saúde promove a distribuição do soro antiofídico, com base nas informações fornecidas a partir da notificação dos acidentes ofídicos nos serviços públicos de saúde. Usualmente, o médico quando diagnostica um acidente ofídico, ele o notifica especificando qual o soro utilizado e quantas ampolas foram necessárias, para o tratamento. O Ministério da Saúde então, com base nas informações fornecidas pelos hospitais, distribuirá as próximas partidas de soro, fornecendo um número de ampolas suficientes para os tipos de acidentes mais frequentes e reduzindo o número de ampolas referentes aos acidentes menos frequentes. Assim, um diagnóstico errôneo, com uma consequente utilização de um soro que não seja específico para o acidente em questão, vai refletir de forma direta na distribuição de soros subsequentes, o que pode promover a falta de soros menos utilizados, em regiões com problema de diagnóstico duvidoso. No caso do acidente causado pela espécie *B. jararacussu*, essa problemática ainda é mais grave, visto que para o tratamento deste acidente, o soro mais indicado seria o antibotrópico-crotálico. Como este soro só é utilizado em acidentes onde os sinais e sintomas clínicos do paciente não são suficientes para diagnosticar se o acidente teve origem

³ Entende-se por “Kit” de diagnóstico uma metodologia de análise laboratorial que resulta na identificação precisa do animal causador do acidente ofídico.

⁴ O teste de ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) ou ensaio enzimático de imuno-aderência ligado à enzima é um teste imunoenzimático em que pode ser mensurado a presença de antígenos ou anticorpos presentes em uma amostra.

botrópica ou crotálica, este soro é distribuído somente em regiões onde há a coexistência de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*.

No entanto, em Estados como o Rio de Janeiro, onde praticamente não há a coexistência destes gêneros, o soro antibotrópico – crotálico somente se encontra disponível em restritas áreas onde aparece serpentes do gênero *Crotalus*. Sabendo-se que, no RJ, as serpentes do gênero *Crotalus* habitam somente pequenas áreas de fronteira com Minas Gerais e, a espécie *B. jararacussu* está presente em todo o Estado, surge um importante problema de saúde pública, visto que na maioria das cidades deste Estado, onde ocorrem, frequentemente, acidentes causados por *B. jararacussu*, o soro mais indicado para o tratamento não se encontra disponível.

Seria muito importante um estudo epidemiológico para os acidentes causados por *B. jararacussu*, não só no Rio de Janeiro, mas em todos os estados em que habita esta espécie, pois tais resultados teriam um desdobramento direto na distribuição do soro antibotrópico–crotálico para estes estados, como também gerar dados para estudos posteriores sobre a eficiência no tratamento do acidente causado por *B. jararacussu*. Estes dados também possibilitariam uma otimização da produção e da distribuição do soro preferencialmente para as regiões necessárias.

1.5 – O DESENVOLVIMENTO DE “KITS” PARA DETECÇÃO DE VENENOS.

Para o desenvolvimento de um teste diagnóstico é preciso a caracterização do material biológico que se deseja diagnosticar, buscando propriedades específicas deste material, que possam ser detectáveis e utilizáveis como ferramentas para o desenvolvimento do “kit”. No caso dos imunodiagnósticos o princípio é o mesmo, porém as ferramentas para o desenvolvimento do “kit” são antígenos e anticorpos. Aos antígenos detentores de especificidade, capazes de serem detectados por anticorpos específicos a estes antígenos, chamamos de biomarcadores.

O primeiro método utilizado para quantificar veneno de serpente em soro sanguíneo de animais e de humanos foi o radioimunoensaio (Coulter et al., 1974). Em seguida veio o uso do ELISA (Ensaio enzimático de imunoaderência ligado à enzima) primeiramente descrito por Theakston *et al.*, 1977. Desde então, este método tem sido refinado por outros autores, em diferentes partes do mundo, com o mesmo objetivo (Theakston 1982; Labrousse et al., 1988; Chaves-Olortegui et al., 1993, 1997; Selvanayagam et al., 1999a; Heneine et al., 1999; O'Leary et al., 2006). Todos estes testes foram desenvolvidos, baseados no método de ELISA duplo sanduíche, com imunoreagentes obtidos a partir de imunização de animais seguido de purificação das igGs por precipitação e cromatografia de afinidade, ou da seguinte forma: Utilizando-se um sistema de cromatografia de imunoafinidade, os venenos são avaliados de forma que as frações não reconhecidas por reação cruzada (ex.: um veneno Laquétrico submetido a um coluna acoplada com soro antibotrópico) eram as que apresentavam especificidade e poderiam ser utilizadas como antígenos para o desenvolvimento de anticorpos espécie-específicos.

Outros métodos utilizando diferentes modificações do método de ELISA também têm sido reportados (Barral-Netto et al., 1990, 1991, Amuy et al., 1997, Dong et al., 2003, Selvanayagam et al., 2002). Os diferentes estudos propõem imunoenaios para detecção de antígenos circulantes e anticorpos anti-venenos, tanto com enfoque diagnóstico como epidemiológico do acidente ofídico. Entretanto, algumas desvantagens podem ser apontadas com relação à utilização destes métodos, para obtenção dos imunoreagentes, no que dizem respeito ao rendimento, reprodutibilidade e ampliação da produção para escala industrial.

Em contraste com esse grande número de publicações propondo diferentes métodos para diagnosticar envenenamentos ofídicos, um número muito reduzido de “Kits” de diagnóstico foram desenvolvidos nas últimas décadas. O “Kit” de detecção de veneno (VDK) produzido pela Commonwealth Serum Laboratories (CSL) na Austrália é o único “kit” de diagnóstico comercial produzido atualmente. Vale ressaltar que, na Austrália são registrados entre

1000 a 3000 acidentes ofídicos e uma média de 2 mortes a cada ano, enquanto que no Brasil, com uma média de 20.000 casos a cada ano (Ministério da Saúde, 1998) e outros países como a Índia com 200.000 casos por ano e uma média de 15.000 mortes, (Ananthapadmanabhan J., 1991) ainda não contam com “Kits” de diagnóstico comercial em seus sistemas públicos de saúde. No que se refere à questão de custo-benefício destes kits para a saúde humana, vale citar Carlos Morel na 2ª Conferência Nacional de Ciência Tecnologia e Inovação em Saúde, onde ressaltou o trabalho de um grupo Canadense, que avaliou quais eram as biotecnologias com maior potencial de aplicação nos países em desenvolvimento. Chegou-se a uma lista das dez biotecnologias de maior impacto, onde métodos de diagnósticos, simples e baratos, baseados em tecnologias moleculares, fazem parte dela (Morel C, 2004).

Considerando o potencial de aplicação tecnológica do desenvolvimento de “kits” de diagnóstico e, especificamente, sua aplicação no contexto do ofidismo no Brasil, seria importante mais estudos nessa área. Dessa forma, a identificação e caracterização imunológica de biomarcadores do veneno da jararacuçu, seria de grande importância para o início do desenvolvimento de um “Kit” de diagnóstico para esta espécie, contribuindo na tentativa de minimizar o problema de Saúde Pública inerente a esta espécie, no Estado do Rio de Janeiro.

Dentro das questões a respeito do diagnóstico diferencial do acidente causado pela *B. jararacussu*, surge a primeira pergunta: Há uma molécula ou algum grupo de moléculas no veneno desta espécie, com propriedade imunológica capaz de serem classificadas como molécula biomarcadora? Bem, buscando a resposta para esta pergunta, nasceu a idéia de se estudar este veneno utilizando uma abordagem denominada proteômica, somado a técnicas imunológicas precisas

1.6 – A PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE VENENOS ANIMAIS.

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez em meados da década de 90 e descreve o conjunto de proteínas codificadas por um genoma (Wilkins, 1996). Diferente de um genoma, que permanece o mesmo em toda a vida de um organismo, o proteoma é dinâmico, ou seja, varia de acordo com o momento e condição em que foi analisado. Já o termo proteômica é definido como o estudo do proteoma levando-se em consideração as mudanças nas taxas de expressão, presença de isoformas, interações proteína-proteína, presença ou ausência de novas moléculas associadas a doenças, como também a maioria das modificações pós-traducionais (Tyers e Mann, 2003).

Uma abordagem clássica da proteômica consiste na utilização da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, usada para separar, detectar e quantificar as proteínas, seguida de hidrólise das amostras e posteriormente a identificação das mesmas através de técnicas de Espectrometria de Massas.

1.6.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Atualmente, a eletroforese bidimensional (2D-PAGE) tem sido largamente utilizada, principalmente pelo fato de ser uma técnica que combina alta resolução com reprodutibilidade. O' Farrel, 1975 foi o primeiro a descrever esta técnica e, desde então, vem sofrendo modificações. Esta técnica consiste na separação de proteínas baseada em duas importantes propriedades, carga elétrica e massa molecular. Na primeira dimensão (Focalização isoeletrica) a separação ocorre com base na carga elétrica da proteína. Nesta etapa (Figura 6), a amostra é submetida a uma migração eletroforética em fita de gel contendo um gradiente de pH. Assim, as proteínas migram horizontalmente no gel até chegarem ao pH em que sua carga líquida seja zero (ponto Isoelétrico) (Berg et al, 2002). Após a focalização isoeletrica concluída, ou seja, as proteínas terem focalizado em seus respectivos pls, a primeira dimensão é concluída.

Na segunda etapa, a fita resultante da primeira dimensão é submetida à tradicional Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Figura 6) para uma segunda separação das proteínas, agora pela diferença no peso molecular das moléculas.

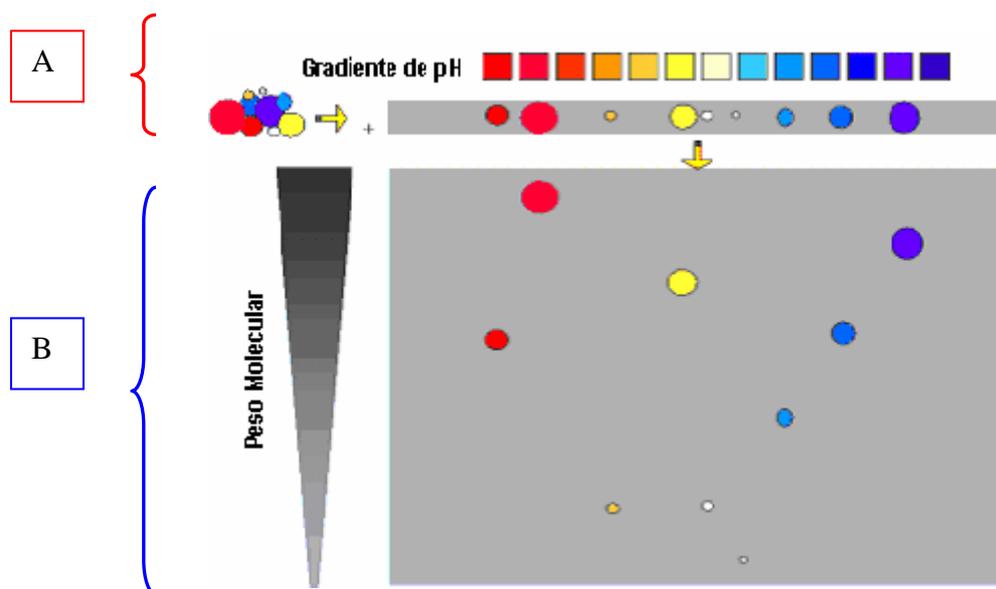


Figura 6: Esquema ilustrativo das duas etapas da 2D-PAGE.

A) Separação por ponto isoelétrico. A mistura de proteínas é submetida a um gel de gradiente de pH sob um campo elétrico, promovendo a focalização destas moléculas em seus respectivos pI. B) Separação por peso molecular. As proteínas focalizadas na primeira dimensão são submetidas a uma SDS-PAGE e de acordo com as diferenças no tempo de migração, as quais estão diretamente relacionadas ao volume da molécula, ocorre a segunda separação da mistura protéica, só que agora com base nos pesos moleculares das proteínas. Fonte: Jing, 2003

1.6.2 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectrômetro de massas é um instrumento analítico que converte os componentes de uma amostra em íons gasosos e mede suas massas. Este aparelho é constituído de cinco componentes principais: sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador de massas, detector e processador de sinais. No começo dos anos 90, métodos suaves de ionização como o MALDI (ionização a laser assistida por matriz) e ESI (eletrospray) foram desenvolvidos e revolucionaram a espectrometria de

massas no campo da pesquisa biológica, pois permitiram a análise de biopolímeros não voláteis por esta técnica. Estas metodologias de ionização (fonte de íons) foram acopladas a diferentes sistemas analisadores. Como exemplo de analisadores, podem ser citados o TOF (tempo de voo), íon trap (armadilha de íons), quadrupolo (Q) e os analisadores associados (tandem) e híbridos TOF/TOF e Q/TOF. As conexões dos sistemas de ionização com os analisadores formaram tipos de espectrômetro de massas bastante utilizado em estudos de biomoléculas, como é o caso do MALDI-TOF, MALDI-TOF-TOF e Q-TOF. Uma diferença básica de nomenclatura e função destes espectrômetros de massas está relacionada ao tipo de análise que estes aparelhos permitem. Por exemplo, como pode ser visto na Figura 7, no MALDI-TOF a mistura de peptídeos gerados a partir da digestão enzimática da proteína alvo sofre ionização e pela diferença no tempo de voo, as respectivas massas são calculadas. Esta análise é do tipo MS (apenas um espectro é formado). Já os espectrômetros de massas do tipo MALDI-TOF-TOF e Q-TOF (Figura 8) permitem análises do tipo MS-MS, ou seja, dois espectros são formados. O termo MS-MS se refere a análises onde a amostra após a ionização atravessa o primeiro analisador (MS_1). Em seguida, os íons de maior intensidade são selecionados, entram na câmara de colisão e são fragmentados. No segundo analisador, os fragmentos são separados e detectados (MS_2). Desta forma, o primeiro espectro gera as informações a respeito do perfil de hidrólise da proteína alvo e o segundo espectro fornece as massas dos fragmentos peptídicos selecionados. Assim, a identificação pode ser realizada utilizando duas estratégias distintas:

- Impressão digital de massas peptídicas da proteína (peptide-mass fingerprint ou PMF). Neste caso a identificação é realizada a partir do espectro de MS. Os fragmentos tripticos de uma proteína são únicos (impressão digital). No espectro de MS, as massas dos peptídeos são obtidas e comparadas com as massas dos peptídeos de proteínas depositadas no em banco de dados.

- Identificação por MS/MS. Neste caso, além da informação a partir da fragmentação tríptica, dados adicionais são adquiridos a partir da fragmentação dos peptídeos mais intensos. Assim, nesta metodologia tanto as massas dos peptídeos gerados a partir da hidrólise e as massas de seus fragmentos são comparadas com estas mesmas informações depositadas em banco de dados.

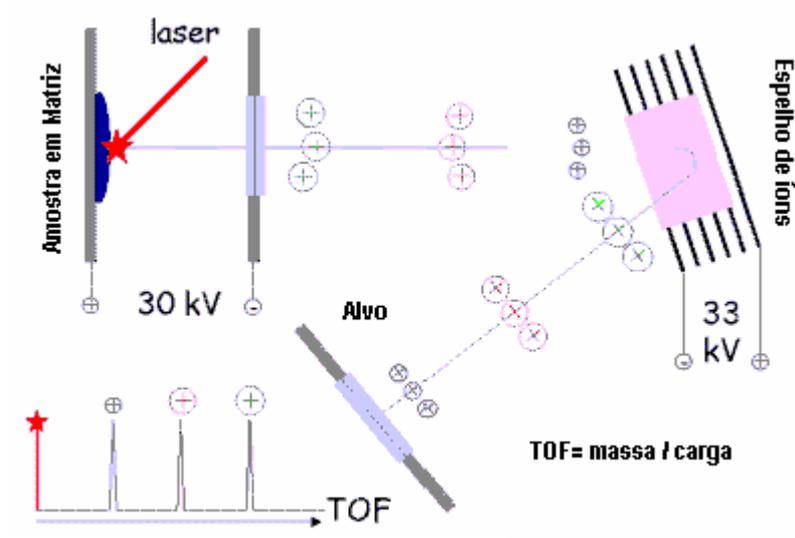


Figura 7: Princípio do MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Os peptídeos da amostra são ionizados e acelerados em um campo elétrico (analisador de massas). São refletidos em um espelho de íons e desviados para melhor resolução. A razão massa/carga é proporcional ao tempo de voo dos íons. Quanto menor a massa do íon, mais rápido é seu tempo de voo. Fonte: Jing, 2003.

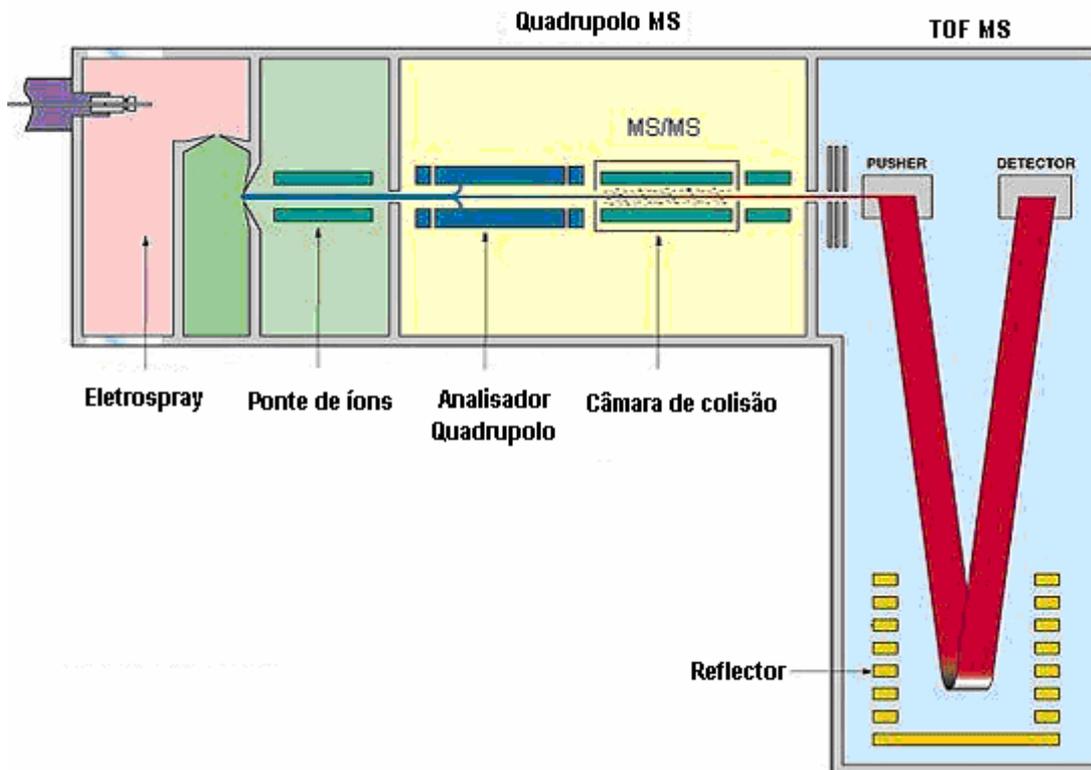


Figura 8: Princípio do Q-TOF. Os peptídeos da amostra são ionizados por Eletrospray (ESI). Em seguida, os peptídeos percorrem o analisador quadrupolo (Q) e suas massas são detectadas (MS1). Os peptídeos mais intensos são selecionados para a câmara de colisão e sofrem fragmentação. Finalmente, as massas dos fragmentos são mensuradas por um analisador do tipo TOF (MS2) e a seqüências dos peptídeos são obtidas. Fonte: <http://www.hybtech.org/Liu.htm>

2 - JUSTIFICATIVA

Com todas essas questões referentes à neutralização do veneno da jararacuçu, somado ao fato desta espécie ter a capacidade de inocular altas quantidades de veneno, tornam os acidentes por ela causados, merecedores de receber uma conduta terapêutica diferenciada, ou seja, ser administrado o soro antibotrópico – crotálico. No entanto, os médicos esbarram na grande dificuldade de se identificar precocemente e apenas pelos sinais clínicos, se o acidente foi provocado por uma serpente da espécie *B. jararacussu* ou por uma outra espécie do gênero. Nos acidentes ofídicos de forma geral, mas principalmente no acidente causado por *B jararacussu*, quanto mais rápido o diagnóstico preciso for feito e o soro específico for administrado, menores as chances de o quadro clínico evoluir para danos teciduais no local da picada. Vale ressaltar que, a administração de soros poliespecíficos deve ser reduzido, visto que o paciente recebe grandes quantidades de imunoglobulinas heterólogas, com afinidade por venenos não relacionado com o acidente, o que aumenta as chances de efeitos indesejáveis, como reações alérgicas severas e doença do soro. Assim, preferencialmente deve-se usar soros monovalentes no tratamento do envenenamento ofídico (Chippaux & Goyffon, 1998; Lalloo & Theakston, 2003). Dessa forma, o soro antibotrópico-crotálico deve ser administrado, exclusivamente nos casos em que haja dúvida no diagnóstico (entre *Bothrops* e *Crotalus*), ou quando for um acidente causado por *B jararacussu*, visto que neste caso, os benefícios justificam o risco de reações adversas.

Com base nos dados apontados acima, surge nítida a necessidade de se diagnosticar precocemente e com exatidão quando um acidente foi produzido especificamente por *B. jararacussu*. Porém, esta é uma tarefa difícil para o médico, quando se utiliza apenas como ferramenta, as manifestações clínicas do paciente. Vale ressaltar que, em todos os estados brasileiros em que habita a jararacuçu (BA, ES, RJ, MG, SP, PR e SC) também habitam outras espécies do gênero, o que torna inviável o diagnóstico diferencial baseado na distribuição geográfica das espécies.

Assim, como primeiro passo para se pensar em um diagnóstico laboratorial para a identificação do acidente causado por *B. jararacussu*, vem a questão sobre a identificação de Biomarcadores. Dentro deste contexto se destaca a abordagem proteômica para o estudo de misturas complexas, como é o caso dos venenos animais, visto que é possível associar a alta resolução e reprodutibilidade, propiciado pela 2D-PAGE na separação das proteínas, somado a rapidez e confiabilidade de sua identificação por espectrometria de massas. Assim, neste trabalho foi utilizada uma abordagem proteômica clássica para o estudo do veneno de *B. jararacussu*, somado a uma técnica imunológica, também muito utilizada no campo da bioquímica, que é o “Imunoblotting”. Esta metodologia, que compreendeu a utilização de 2D-PAGE para o fracionamento do veneno de *B. jararacussu* seguido de análise por Imunoblotting, foi inédita para o estudo de veneno de serpentes.

3 – OBJETIVOS

Com base em todos os questionamentos acima apresentados, que envolvem a espécie *B. jararacussu*, o seu veneno, os acidentes e a clínica dos mesmos, fica evidente a necessidade de uma ferramenta para apontar com precisão quais acidentes são causados pela *B. jararacussu*, propiciando assim um tratamento adequado ao paciente. Nestes fatos se centra o objetivo geral do presente trabalho: desenvolver um estudo buscando identificar moléculas com potencial biomarcador, para serem utilizadas como ferramentas para o desenvolvimento de um Kit diagnóstico diferencial para este acidente, mediante uma abordagem proteômica somado a técnicas imunológicas clássicas, como o “Imunoblotting”.

Os objetivos específicos como segue abaixo, representaram os tópicos seguidos para atingir os propósitos acima citados:

- I. Produção de anticorpos policlonais contra o veneno das espécies *B. jararaca* e *B. jararacussu*.
- II. Determinação do perfil da eletroforese bidimensional do veneno de *B. jararacussu*.
- III. Análise da presença de biomarcadores nos venenos estudados, por SDS-PAGE e 2D-PAGE seguida de “Imunoblotting”.
- IV. Análise da presença de biomarcadores avaliando amostras purificadas deste veneno.
- V. Identificação dos possíveis biomarcadores por espectrometria de massas (MS e MS/MS)
- VI. Caracterização bioquímica dos candidatos a biomarcadores.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - VENENOS -

A Divisão de Zoologia Médica do IVB possui um banco de venenos representado por um importante número de espécies de serpentes do Brasil e de algumas espécies exóticas, principalmente para atender à produção de imunobiológicos e visando também a pesquisa científica. Os venenos são coletados, de pelo menos cinquenta exemplares, e reunidos para liofilização (pool). Foram utilizados “pools” de venenos de das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca* procedentes do estado do Rio de Janeiro

4.2 – ANIMAIS –

Foram utilizados animais de laboratório especificamente camundongos suíços brancos para os testes de potência de venenos e anti-venenos, e cavalos para a produção dos soros policlonais espécie específico. Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados na Divisão de Vacina a Vírus do IVB, sob a responsabilidade técnica dos profissionais dessa instituição, seguindo os protocolos da farmacopéia brasileira.

4.3 – AVALIAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL₅₀) –

Este experimento foi realizado na Divisão de Vacina a vírus do IVB e o protocolo utilizado para a determinação da dose letal 50% (DL₅₀) teve como base o indicado pelo Ministério da Saúde, 1996. Os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foram diluídos em solução salina 0,85% na concentração de 1 mg/mL (solução estoque). Foram distribuídos volumes crescentes da solução estoque, mantendo um fator de diluição de no máximo 1.5, em tubos separadamente e adicionado solução salina de forma a se obter as doses desejadas (30, 45, 60, 100 µg). Para cada dose foi separado um grupo de 8 camundongos pesando entre 17-22 g e

inoculado um volume constante de 0,5 mL, pela via intraperitoneal. Os camundongos foram observados por 48 horas e o número de mortos foi utilizado para calcular a DL_{50} pelo método estatístico de PROBIT.

4.4 - IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA OBTENÇÃO DE SOROS POLICLONAIS –

Os Soros espécie - específicos (anti-jararaca e anti-jararacussu) foram produzidos em cavalos, seguindo plano de imunização já estabelecido pelo Departamento de Soros do Instituto Vital Brazil (IVB). Resumidamente, para cada antígeno foi utilizado dois Eqüinos e um plano de imunização de 10 semanas (Tabela 1) utilizando os seguintes adjuvantes: Completo de Freund, Marcol Montanid e Hidróxido de Alumínio ($Al(OH)_3$). As doses de veneno utilizadas foram de 2,5 mg e 5,0 mg por animal. Após a 10ª semana foi retirada uma amostra de 250 mL de sangue de cada cavalo. Este sangue foi desorado e os soros espécie específicos foram alíquotados e congelados, separadamente.

Tabela 3: Plano de imunização. Para a produção dos soros policlonais anti-jararaca e anti-jararacussu foi utilizado um plano de dez imunizações. A dose de veneno por animal e o período de imunização são mostrados na coluna 2 e 8 respectivamente. Os adjuvantes utilizados foram Freund completo (freundcomp), Marcol + Montanid (marcolmont) e Hidróxido de Alumínio 10% ($Al(OH)_3$)

Plano de Imunização e Preparo da Solução de Veneno.

Dose	Dose de Veneno por equino (mg)	Número de equinos	Quantidade total de veneno + 10% (mg)	Adjuvante	Volume de Adjuvant (mL)	Volume total (mL)	Data Inoculação	Volume a ser inoculado por equino (mL)
1	2,5	2	5,5	freundcomp	5,5	11	01/07/05	5
2	2,5	2	5,5	marcolmont	5,5	11	12/07/05	5
3	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	19/07/05	10
4	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	06/07/05	10
5	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	02/08/05	10
6	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	09/08/05	10
7	5	2	11	marcolmont	11	22	16/08/05	10
8	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	23/08/05	10
9	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	30/08/05	10
10	5	2	11	$Al(OH)_3$	11	22	06/09/05	10

4.5 –AVALIAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% –

Este experimento foi realizado na Divisão de Vacina a Vírus do IVB e o protocolo utilizado para a determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀) teve como base o indicado pelo Ministério da Saúde, 1996. Uma quantidade fixa (cinco vezes o valor da DE₅₀ do respectivo veneno) dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foram incubados com doses variadas dos soros anti-jararaca e anti-jararacuccu, por 30 min a 37° C. Cada mistura (0,5 mL) foi injetada via intraperitoneal em grupos de 8 camundongos suíços de 18-22 g. Os camundongos foram observados por 48 horas e o número de mortos foi utilizado para calcular a DE₅₀ pelo método estatístico de PROBIT. A DE₅₀ é definida como sendo a quantidade de veneno em mg neutralizada por 1 mL de soro.

4.6 –TÉCNICA DE DOT-BLOTTING –

O veneno de *Bothrops jararacussu* foi diluído na concentração de 1 mg/mL em TTBS (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M e 0,05% Tween 20). Alíquotas de 1 µl foram aplicadas manualmente sobre membrana de PVDF. A seguir, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Molico, Nestle®) diluído em TTBS, por 1.5 horas, a temperatura ambiente sob agitação. Os soros hiperimunes foram diluídos em TTBS com 1% de leite na proporção de (1:100, 1:500, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000) e incubados por aproximadamente 18 horas (overnight) a temperatura ambiente, sob agitação. Após duas lavagens com TTBS por 10 minutos, as membranas foram incubadas com conjugado imunoenzimático anti-IgG de cavalo, marcado com peroxidase (Sigma®) (1/10.000) diluídos em TTBS com 1% de leite, por 1.5 horas a temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram lavadas duas vezes com TTBS e uma vez com TBS (Tris 20 mM e NaCl 0,5 M) e reveladas utilizando-se kit de detecção para “Imunoblotting” (Bio Rad®).

4.7 – TÉCNICAS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA –

4.7.1 - SDS-PAGE

Os venenos (25 µg) foram fracionados em gel de poliacrilamida 15% em presença de SDS, sob condições redutoras e não redutoras (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras foram fervidas em banho-maria em tampão de amostra (Tris/HCl 12 mM, pH 6,8 20% de glicerol, 0,5% SDS, EDTA 0,1 M e 0,05% de Azul de Bromofenol e DTT) por 5 minutos e aplicadas em um gel de empilhamento de 4% de poliacrilamida. Os venenos foram então, submetidos a um campo elétrico de amperagem constante de 20 mA com voltagem em torno de 200V, banhado em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,19 M, pH 8,3 contendo 0,1% de SDS). Após o termino da corrida, os géis foram corados com Azul de Coomassie (0,5% de Azul de Coomassie R-250, 45% de metanol e 10% de ácido acético) e descorados com uma solução de 37% de metanol e 10% de ácido acético ou transferidos para membrana de PVDF.

4.7.2 - 2D-PAGE

Os venenos total de jararacuçu e suas frações pré-purificadas foram analisados por eletroforese bidimensional, nos Sistemas IPGPhor e Ettan Daltsix (Amersham Biosciences) ou Mini ProteanII (Bio-Rad). Para a primeira dimensão utilizou-se tiras de 7 cm e 18 cm com gradiente de pH imobilizado nos intervalos de 4 a 7 e 3 a 10. O material analisado (sempre liofilizado) foi solubilizado em tampão (8M uréia, 2% CHAPS, 0,5% IPG, 0,002% azul de bromofenol⁵) da seguinte forma: 200 µg em 125 µl (para géis de 7cm) ou 1,8 mg em 340 µl (para géis de 18cm). Em seguida as fitas foram cobertas com *DryStrip cover fluid* (Amersham Biosciences) para evitar ressecamento do gel e submetidas as seguintes voltagens: 60V durante 12h, 100V/1h, 200V/1H, 500V/1h, 1000V/1H e 3500V durante 4h (para géis de 7cm) e 60V por 12h, 200V/1h, 500 V/1h, 1000v/1h, 8000V durante 9 horas (para géis de 18cm).

⁵ Em condições redutoras foi adicionado 0,1M DTT no tampão.

Entre a primeira e a segunda dimensão as tiras focalizadas foram equilibradas em soluções contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002 %, em condições redutoras com a adição de 1% de ditioneitol (DTT) e 2,5 % de iodoacetoamida como agente alquilante, por 30 minutos, ou em condição não redutora, sem a adição deste reagentes por 60 minutos. Na segunda dimensão, utilizou-se géis de 15% de poli(acrilamida). Para os géis de 18 cm foi utilizado o sistema Ettan DaltSix (Amersham Biosciences) e as condições elétricas, para cada gel foram: 600 V, 400 mA e 5 W por 30 minutos, aumentando somente a potência para 25 W e permanecendo por mais 6 horas (ou o tempo necessário para a linha de base chegar ao final do gel). Para as fitas de 7 cm foi utilizado o sistema Mini-Protean (Bio-Rad) sob as mesmas condições utilizadas na SDS-PAGE.

Após a corrida eletroforética, os géis foram submetidos a tratamento de fixação por 2 horas, nas seguintes condições: a primeira 1^a hora em solução de Etanol 30 %, Acido fosfórico 2 % , em seguida mais 30 minutos em ácido fosfórico 2 % e finalmente mais 30 minutos na solução de ácido fosfórico 2 %, etanol 18 %, sulfato de amônio 15 %. Após a etapa de fixação os géis foram corados com Coomassie Blue G (1%) por 12 horas e descorados com água.

4.8 - ANÁLISE DE IMAGENS

Os mapas bidimensionais obtidos foram escaneados no ImageMaster LabScan v3.01 (com resolução de 300 dpi) e analisados através do programa ImageMaster Platinum v1.0 (Amersham Biosciences). O primeiro passo na análise dos géis foi a detecção manual dos *spots* seguido de uma análise densitométrica. A seguir foram utilizadas as ferramentas de remoção de *background* e normalização. Posteriormente, os géis foram calibrados, utilizando uma escala linear de pH e padrões de peso molecular (Amersham Biosciences) e o ponto isoelétrico e peso molecular das proteínas foram determinados.

4.9 – TÉCNICA DE IMUNOBLOTTING –

Após fracionamento por SDS-PAGE ou 2D-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Towbin et al. 1979). A seguir, as membranas sensibilizadas foram submetidas a caracterização imunoenzimática de acordo com Anderton & Thorpe, 1980. Foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se TTBS (Tris 20mM, NaCl 0,5M, pH 7,5 e 0,05% Tween 20) com 5% de leite desnatado (Molico, Nestle®) por 1,5 horas em temperatura ambiente, sob agitação. Após a etapa de bloqueio, as membranas foram lavadas duas vezes com TTBS por 10 minutos. Os soros hiperimunes foram diluídos em TTBS com 1% de leite, na proporção de 1:1000, e incubados por aproximadamente 18 horas (overnight) a temperatura ambiente, sob agitação. Após duas lavagens com TTBS por 10 minutos, as membranas foram incubadas com conjugado imunoenzimático anti-IgG de cavalo, marcado com peroxidase (Sigma®) (1/10.000) diluídos em TTBS com 1% de leite, por 1,5 horas a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas duas vezes com TTBS e uma vez com TBS (Tris 20mM e NaCl 0,5M) e reveladas utilizando-se kit de detecção para “Imunoblotting” (Bio Rad®).

4.10 - PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISE DO GRAU DE PUREZA.

4.10.1 - ISOELETRIFOCALIZAÇÃO – O veneno de *B. jararacussu* foi fracionado por focalização isoeletrica, utilizando-se o aparelho Rotofor Cell (Bio Rad®) conforme descrito por Aguiar, 1996. Resumidamente, o veneno foi solubilizado em 15 mL de Tris-HCl pH 7,5 e adicionado 2 % de anfólito para gradiente de pH 3 a 10 (Bio Rad) e centrifugado a 5000g (Sorval). O sistema foi primeiramente refrigerado a 4°C, já com as soluções de anodo (H₃PO₄ 0,1M) e catodo (NaOH 0,1M) em seus respectivos recipientes. Em seguida, a amostra foi aplicada e a voltagem foi determinada para iniciar em 300 V, devendo atingir 1000 V dentro do período da corrida, que foi realizada em 6 h.

4.10.2 - CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO – Inicialmente, 500 mg de veneno liofilizado de *B. jararacussu* foi homogeneizado em 5 mL de Tampão (20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl) em pH 8,8 sob refrigeração (4° C). A coluna Sephacryl S-200 HR (2,6 X 100cm) foi equilibrada com o mesmo tampão de homogeneização. Em seguida, após o sistema ser equilibrado, a amostra foi aplicada na coluna em um fluxo de 1 mL/3,5 min e as frações foram coletadas em alíquotas de 4 mL. A eluição da amostra foi monitorada por absorbância em 280 nm.

4.10.3 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM ALTA PERFORMANCE (HPLC) - Experimentos de cromatografia líquida de alta performance foram realizados para avaliar o grau de pureza da amostra eluída no pH 2,2 do Rotofor Cell. Estes experimentos foram realizados utilizando-se a coluna de gel filtração ou exclusão molecular TSK-GEL de 30cm X 7,8mm, acoplada a um sistema de HPLC, contendo detectores de absorbância e fluorescência (Shimadzu, Japão). O sistema foi equilibrado com tampão A (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) em utilizado um fluxo de 1 mL/min. O volume de amostra aplicada na coluna foi de 50 µl. A eluição das amostras foi monitorada pela fluorescência em 330 nm (com excitação fixa em 280 nm) e pela absorbância em 280 nm.

4.11 - DIGESTÃO TRÍPTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

As Proteínas de interesse foram digeridas ou *in gel*, ou em solução, pela enzima tripsina (Promega Madison, WI, USA). Em gel, a metodologia foi realizada da seguinte forma: Os *spots* de interesse foram retirados do gel e colocados em tubos de 0,5 mL (eppendorf). Em seguida, os géis foram descorados com Bicarbonato de Amônio 25 mM/ acetonitrila 50% por 12 h. A solução anterior foi retirada e adicionado 10 mM de DTT em 25mM de NH₄CO₃ por 1 hora a 56°C. Após esta etapa a solução foi substituída por 55mM de Iodoacetamida por 45 minutos (reação no escuro). Toda a solução foi retirada e os géis foram lavados com 25 mM NH₄CO₃ / 50 % acetonitrila e em seguida desidratados com 100 % de acetonitrila. Finalmente, os géis após estarem secos foram reidratados com uma solução de NH₄CO₃ 25 mM contendo 100 ng de tripsina e permanecerem

nesta solução por 16-20 horas a 37°C (digestão). Após a hidrólise, os peptídeos foram extraídos com uma solução de TFA 5%/Acetonitrila 50 % e o volume reduzido para 10 µl.

4.12 - ESPECTROMETRIA DE MASSAS –

Após hidrólise as amostras foram misturadas com uma matriz de ácido α -ciano 4-hydroxicinâmico em solução 50 % de acetonitrila e 1 % de ácido trifluoroacético, para então serem analisadas no MALDI-TOF ou MALDI-TOF-TOF. Os espectros foram adquiridos no modo refletido com o dispositivo “extração atrasada”, na faixa massa/carga de 800 a 4000 daltons. As misturas foram aplicadas na placa (1 µl) e secas à temperatura ambiente. Em seguida, os espectrômetros foram calibrados utilizando como padrão uma mistura comercial de peptídeos de massa conhecida: Calmix1, Applied Biosystem. No MALDI-TOF, as massas dos íons observados, correspondiam as massas dos peptídeos obtidos da digestão trípica e detectados no espectrômetro (mapa peptídico). No MALDI-TOF-TOF, além do espectro de MS, foi gerado espectros MS/MS a partir da fragmentação dos dez íons mólis abundantes. As massas obtidas por MS ou MS/MS foram submetidas a pesquisa no banco de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) com o auxílio do programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Inglaterra). Foi utilizado o modo de busca por identidade e foi considerado o incremento de massa resultante da alquilação das cisteínas pela iodoacetoamida durante a etapa de equilíbrio das tiras iso-eletrofocalizadas e duas clivagens de tripsina perdidas, $\pm 0,8$ Da para MS e $\pm 0,6$ Da para MS/MS.

As amostras não identificadas pelos métodos anteriores foram analisadas no espectrômetro de massa Q-Tof Ultima API (Waters) do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) cuja fonte de ionização é do tipo eletron spray e os analisadores são um quadrupolo e um tempo de vôo. Este equipamento está acoplado a uma coluna de desalinização (Waters Opti-Pak C18 trap column) e uma coluna capilar C18 (Nanoease C18, Waters). Neste caso, a identificação de proteínas é realizada por MS/MS pela interface do programa Mascot (Matrix Science, version 2.1). Na pesquisa foram usados os

valores de massas monoisotópicos dos espectros MS/MS (MS/MS Ion Search), considerando carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação da metionina como modificação variável. Na hidrólise, por tripsina, foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de ± 0.05 Da.

4.13 - ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR BIOINFORMÁTICA

4.13.1 - ANÁLISE DE SIMILARIDADE – Os peptídeos identificados por espectrometria de massas foram avaliados quanto a similaridade de estrutura primária utilizando o programa BLAST Network Service do NCBI.

4.13.2 - ALINHAMENTO MÚLTIPLO – Os peptídeos identificados por espectrometria de massas foram submetidos a alinhamento múltiplo de seqüências utilizando um algoritmo do programa MUSCA (IBM Bioinformatics group) com base em Parida, 1998.

4.14 - CARACTERIZAÇÃO DA BJSSU-PI2,2

4.14.1 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA – O ensaio de atividade amidolítica foi realizado utilizando BApNA como substrato, conforme descrito por Aguiar, 1996. O substrato foi solubilizado em Tris-HCl 50mM pH 8,0 e adicionado 0,2, 1,0 e 2,0 μ g de proteína. A digestão ocorreu a 37°C e a mudança na absorbância a 410nm foi monitorada por 1 hora.

4.14.2 – ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA – As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL), contendo como fonte de luz uma lâmpada de Xenônio de 300 watts, utilizando-se fendas de 2mm para excitação e 1mm para emissão. As medidas foram realizadas com a utilização de cubetas de quartzo de 1mL. Os espectros de emissão de fluorescência dos triptofanos são obtidos excitando-se as amostras a 280nm e coletando a emissão na faixa de 300 a 400nm.

4.14.3 – ESPECTROPOLARIMETRIA DE DICROISMO CIRCULAR – A análise por Dicroísmo Circular (CD) foi realizada em um espectropolarímetro Jasco-715 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) utilizando um caminho óptico de 1,0mm e cubeta de quartzo. A Bjsu-pl2,2 (0,2mg/mL) foi dialisada em PBS para determinação do espectro. Os dados foram coletados na velocidade de 50nm/min. A linha de base (somente o tampão) foi subtraída do espectro. Para a deconvolução da curva do espectro do CD foi utilizado o programa CD PRO, analisado pelos pacotes 1, 3, 4 e 7.

5 - RESULTADOS

5.1 – PRODUÇÃO E ANÁLISE DOS SOROS POLICLONAIS ESPÉCIE - ESPECÍFICOS.

A primeira etapa do trabalho constituiu na produção de soros policlonais espécie – específico para os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, bem como a titulação e reatividade cruzada destes venenos. Estes soros foram produzidos utilizando-se uma imunização de 10 semanas e todos os experimentos foram realizados com soros provenientes de uma mesma sangria. Como objetivo principal, esta etapa foi realizada, buscando-se a produção de anticorpos específicos, separadamente, para os dois venenos avaliados, para serem utilizados no estudo imunoquímico do veneno de *B. jararacussu*, como também na triagem de proteínas espécie específicas (biomarcadores) deste veneno.

5.1.1 - Titulação dos soros espécie específicos

Inicialmente, os soros espécie específicos foram avaliados, ambos, para o reconhecimento do veneno de *B. jararacussu*, buscando a padronização do título a ser utilizado nos experimentos subseqüentes. As diluições dos respectivos soros foram de 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000 e titulados por Dot-blotting. A escolha da diluição ideal partiu da premissa de ser a maior diluição que conferisse reconhecimento, capaz de ser detectado pelo método, frente, especificamente, ao veneno de *B. jararacussu*. A diluição ideal foi estabelecida em 1:1000 para utilização nos imunoenaios subseqüentes.

5.1.2 - Avaliação da soroneutralização cruzada *in vitro*, dos soros espécie – específicos.

Inicialmente, foram avaliados os perfis eletroforéticos dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* e identificado suas principais variabilidades inter-específicas. Analisando o perfil eletroforético dos “pools” de venenos utilizados, o veneno de *B. jararacussu* apresentou bandas majoritárias na faixa de peso molecular aproximado de 121, 100, 60, 53, 35, 29, 27, 14 e 13 kDa, quando analisado em condições não redutoras (sem DTT) e 54, 40, 37, 35, 27 e 14 kDa, quando analisado em condições redutoras. Já o veneno de *B. jararaca*

teve suas principais frações nas faixas de peso molecular aproximadas de 130, 121, 100, 54, 39, 37, 29, 27 e 14 kDa, quando analisado em condições não redutoras e 54, 39, 37, 35, 30, 29, 17, 14 e 13 kDa (Figura 9). Como pode ser visto, há diferenças marcantes nos perfis eletroforéticos destes venenos, principalmente quando analisados em condições não redutoras.

Como próximo passo, o veneno de *B. jararacussu* foi analisado por “Imunoblotting”, frente ao soro anti-jararacussu (homólogo) e anti-jararaca (heterólogo). Neste experimento o veneno foi fracionado por SDS-PAGE e o perfil imunológico deste veneno pôde ser avaliado. Como pode ser visto na Figura 10, as principais frações deste veneno, detectadas por SDS-PAGE, foram reconhecidas pelo soro homólogo. Comparando o reconhecimento conferido pelo soro heterólogo, pode ser observado um melhor reconhecimento das frações abaixo de 15 kDa.

Na amostra analisada sem DTT, o soro anti-jararaca reconhece fortemente uma fração de peso molecular acima de 105 kDa o que não é visto no reconhecimento pelo soro homólogo. Ainda com referência as amostras sem DTT, pôde-se notar uma maior intensidade no reconhecimento das frações de aproximadamente 10 a 30 kDa pelo soro heterólogo, mostrando alta similaridade destas frações com o veneno de *B. jararaca*. Nas regiões de 50 a 60 kDa há um reconhecimento mais intenso destas frações pelo soro homólogo, o que ocorre mais fracamente pelo soro heterólogo. No entanto, nas amostras corridas com DTT, o soro homólogo perde o reconhecimento das frações de 50 e 60 kDa, passando a reconhecer mais fortemente uma banda na região de 75 kDa. Já o soro heterólogo também passa a reconhecer fortemente uma banda nesta região. Vale ressaltar que, com essa abordagem, não foi possível conferir especificidade a alguma proteína deste veneno. No entanto, esses resultados permitiram identificar algumas regiões, como as de peso molecular abaixo de 15 kDa, para serem avaliadas com mais precisão.

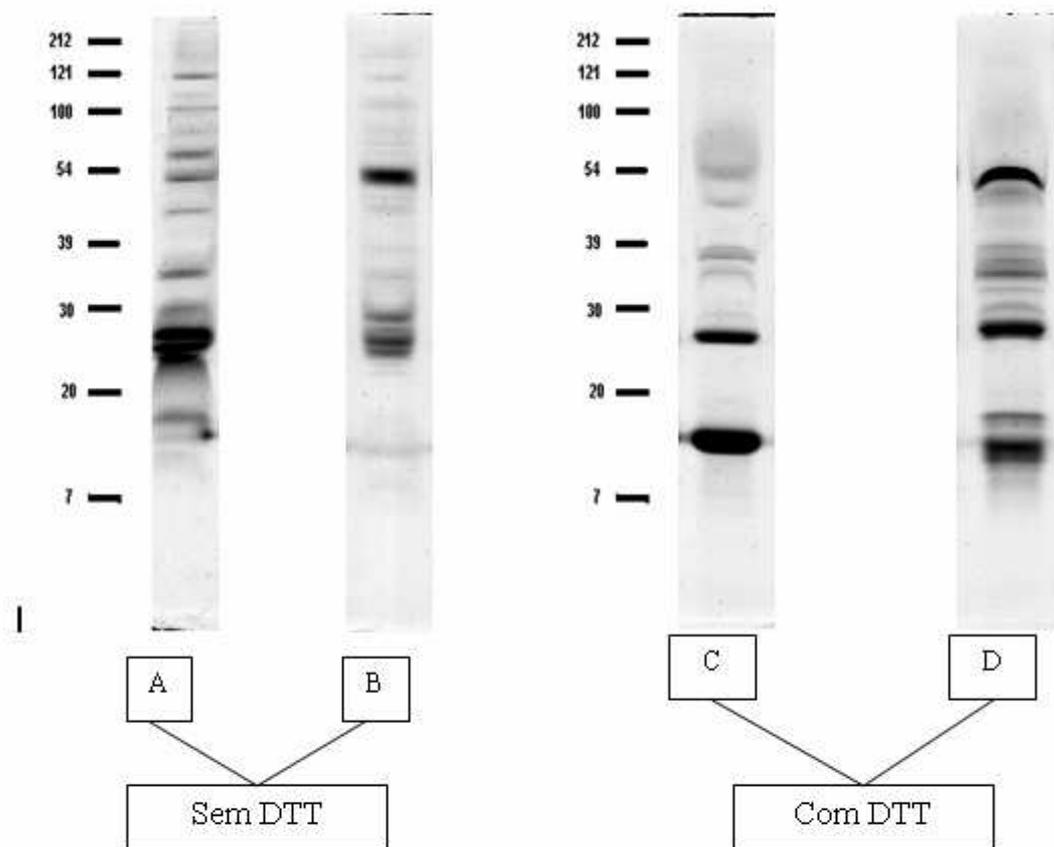


Figura 9: Perfil eletroforético dos venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca*.

Os pools de venenos de *B. jararacussu* (A e C) e *B. jararaca* (B e D) (25 µg) foram fracionados em SDS-PAGE com gradiente de 8 a 18% de poliacrilamida em condições não redutoras (A e B) e redutoras (C e D); corados com Azul de Coomassie. Os números à esquerda indicam a migração dos marcadores de massa molecular (kDa):

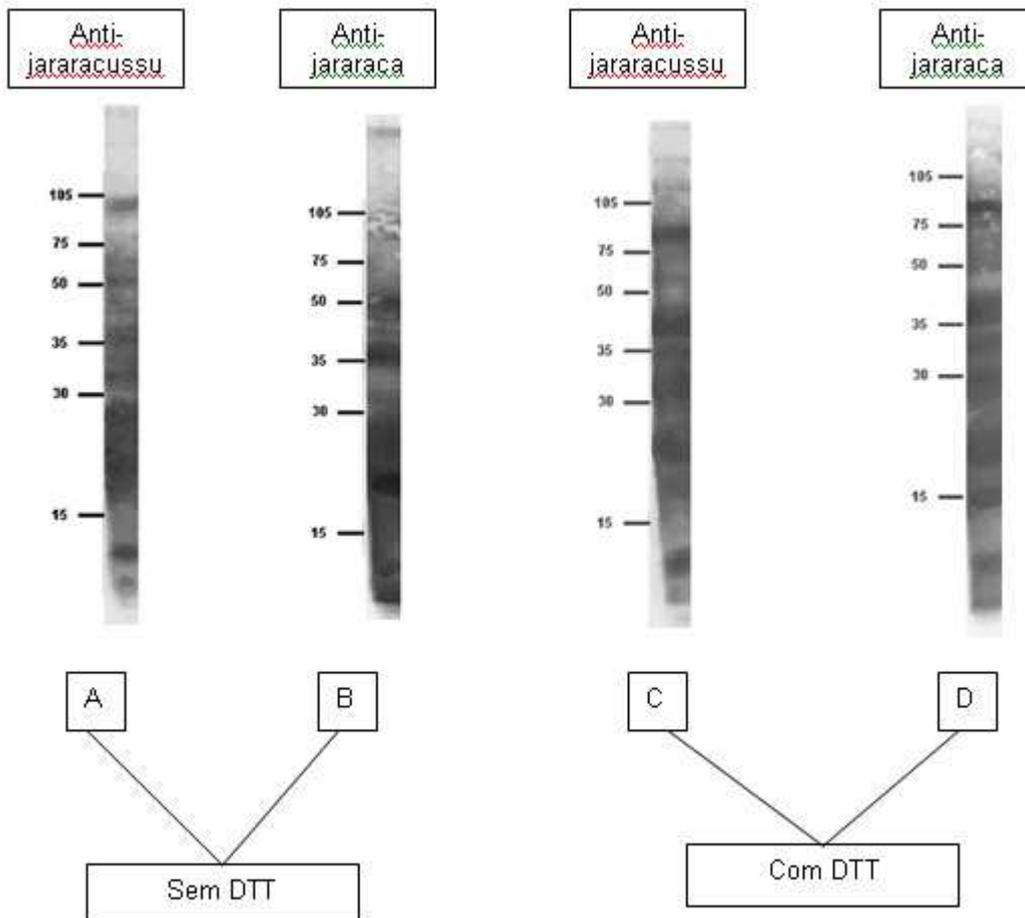


Figura 10: Imunoblotting do veneno de *B. jararacussu*.

O pool de veneno de *B. jararacussu* (25 μ g) foi fracionado em SDS-PAGE com gradiente de 8 a 18%, em condições não redutoras (A e B) e redutoras (C e D). Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e incubadas com soro anti-jararacussu (A e C) e anti-jararaca (B e D) na diluição de 1:1000.

5.1.3 - Avaliação da Soroneutralização cruzada *in vivo*, dos soros espécie – específicos.

Visto que o veneno de *B. jararacussu* é bem reconhecido, tanto pelo soro homólogo, como pelo o heterólogo, o próximo passo deste estudo compreendeu uma análise *in vivo* de soroneutralização. Estes experimentos se destacam por dois pontos principais: o primeiro, se refere a questão de controle de qualidade dos soros produzidos para este estudo, verificando se os animais responderam bem à imunização; e segundo, se refere a questão de se avaliar a soroneutralização cruzada dos veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, verificando seu caráter antigênico, ou seja, se os referidos venenos se comportam similarmente como bons imunógenos, ou se comportam de forma distinta na resposta imune. Resumidamente, este experimento foi realizado da seguinte forma:

- ✓ A DL₅₀ de cada veneno foi previamente determinada e como resultado se obteve 54,8µg para o veneno de *B. jararaca* e 118,36µg para o veneno de *B. jararacussu*, corroborando com os valores já vistos em literatura.
- ✓ Em seguida, cinco gupos de oito camundongos foram desafiados com uma dose fixa de veneno, estabelecida em 5X o valor da DL₅₀, sendo primeiramente incubada por 30 minutos com doses crescentes de soro e então inoculada no camundongo por via intraperitoneal.
- ✓ Assim, os camundongos desafiados com o veneno de *B. jararaca* receberam 274µg deste veneno e os desafiados com o veneno de *B. jararacussu* receberam 591,8µg. Vale ressaltar, que a DL₅₀ de um veneno é a dose capaz de matar 50% dos animais analisados e uma dose de 5X maior que a DL₅₀ é mais que suficiente para matar todos os animais analisados.
- ✓ A proteção conferida pelos soros foi calculada levando-se em consideração o número de animais que permaneceram vivos após 48h, como pode ser visto nas Tabelas 4 e 5 a seguir.

Tabela 4: Resultado da soroneutralização *in vivo* do veneno de *B. jararaca* frente aos soro homólogo e heterólogo. Os resultados são expressos em quantidade de veneno (mg) neutralizado para cada mL de soro avaliado.

Veneno Desafio: <i>Bothrops jararaca</i> (DL₅₀ = 54,8µg)		
Soro	Número do Equino	Resultado Neutralização
Anti - jararacussu	406	0,43 mg/mL
Anti - jararacussu	408	0,53 mg/mL
		Média = 0,48 mg/mL
Anti – jararaca	409	4,4 mg/mL
Anti - jararaca	423	2,2 mg/mL
		Média = 3,3 mg/mL

Tabela 5: Resultado da soroneutralização *in vivo* do veneno de *B. jararacussu* frente aos soro homólogo e heterólogo. Os resultados são expressos em quantidade de veneno (mg) neutralizado para cada mL de soro avaliado.

Veneno Desafio: <i>Bothrops jararacussu</i> (DL₅₀ = 118,36µg)		
Soro	Número do Equino	Resultado Neutralização
Anti – jararacussu	406	1,0 mg/mL
Anti – jararacussu	408	2,44 mg/mL
		Média = 1,72 mg/mL
Anti – jararaca	409	1,0 mg/mL
Anti – jararaca	423	0,73 mg/mL
		Média = 0,86 mg/mL

É importante ressaltar que o soro anti-jararaca neutraliza melhor os efeitos tóxicos do seu próprio veneno (3,3 mg/mL), quando comparado com o soro anti-jararacussu também para o seu próprio veneno (1,72mg/mL), corroborando com a literatura no que se refere a baixa imunogenicidade do veneno de *B. jararacussu*. Outro ponto importante pode ser visto com referência a neutralização cruzada destes soros. O soro anti-jararaca é duas vezes mais eficiente na neutralização do veneno de *B. jararacussu* (0,86mg/mL) comparado com a neutralização conferida pelo soro anti-jararacussu frente ao veneno de *B. jararaca*.

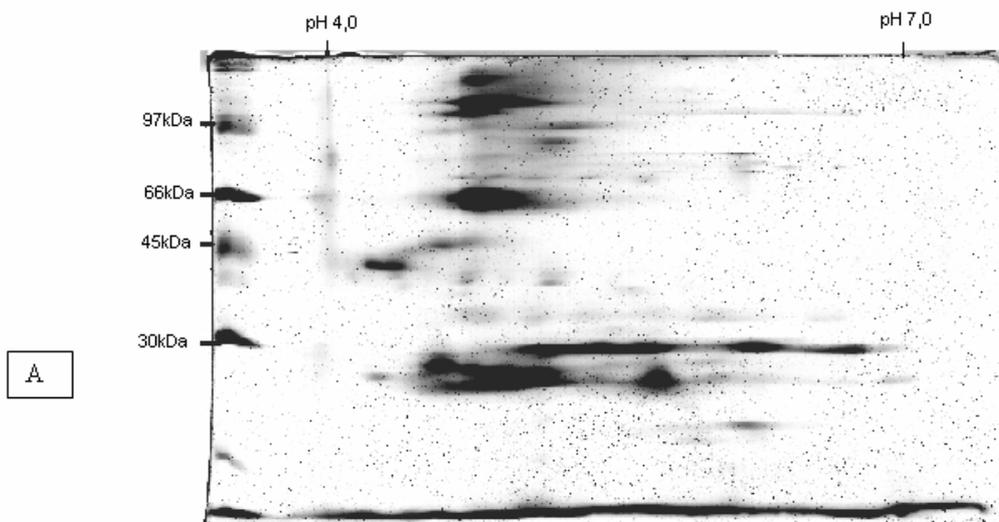
5.2 – Desenvolvimento do mapa bidimensional do veneno de *B. jararacussu* e análise do perfil antigênico.

A próxima etapa do trabalho consistiu em padronizar o uso da eletroforese bidimensional (2D-PAGE) para o estudo do veneno de *B. jararacussu*, desenvolvendo o seu mapa bidimensional, o qual serviu como base para a identificação das principais proteínas de interesse. Além disso, a 2D-PAGE somada a técnica de ‘Imunoblotting’ e a utilização dos soros anti-venenos, homólogo e heterólogo, permitiu uma análise mais detalhada do perfil imunológico deste veneno.

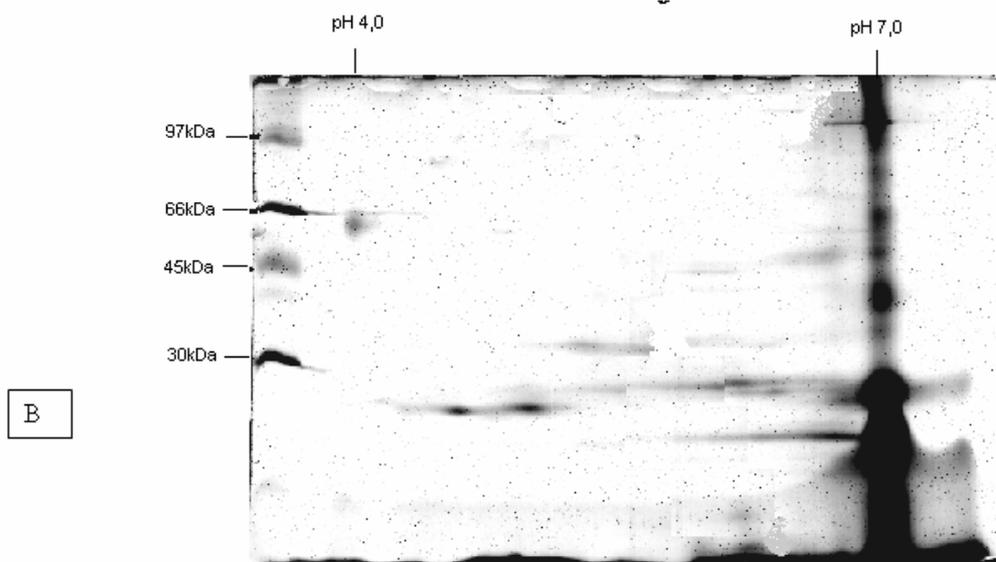
5.2.1 - Padronização da técnica de eletroforese bidimensional para o estudo do veneno de *B. jararacussu*.

A eletroforese bidimensional ou 2D SDS-PAGE consiste em uma técnica que, comparado com a tradicional SDS-PAGE, permite um melhor fracionamento de amostras complexas, como é o caso dos venenos.

No laboratório onde foram realizados os experimentos de 2D SDS-PAGE, já haviam sido estabelecidos os parâmetros para a utilização desta técnica, para o estudo do veneno de *Bothrops jararaca*. No entanto, para o veneno de *B. jararacussu*, nenhuma experiência tinha sido feita. Como pode ser visto na Figura 11A, o veneno de *B. jararaca* é composto por proteínas, quase que na sua totalidade, com ponto isoelétrico na região ácida. As proteínas majoritárias deste veneno compreenderam a faixa de peso molecular em torno de 100, 66 e 30 kDa. Já o veneno de *B. jararacussu*, a maior parte das proteínas focalizaram na região básica, indicando uma importante diferença entre estes venenos (Figura 11B). Devido ao caráter básico das principais proteínas do veneno de *B. jararacussu* foi padronizado o uso de fitas de gradiente entre 3 e 10 para o estudo deste veneno.



2D-PAGE veneno de *B. jararaca* pH 4-7



2D-PAGE Veneno de *B. jararacussu* pH 4-7

Figura 11: 2D-PAGE do veneno de *B. jararacussu* e *B. jararaca*.

Neste experimento, 200ug dos venenos de *B. jararaca* (A) e *B. jararacussu* (B) foram analisados por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Na primeira dimensão, as proteínas do veneno foram submetidas a fracionamento utilizando-se fitas de 7 cm e uma faixa de pH entre 4 e 7. Em seguida, as proteínas focalizadas em seus respectivos pI foram separadas em SDS-PAGE 15%, sob condições não redutoras. Os géis foram corados com Comassie Blue G, conforme descrito em Materiais e Métodos

Como pode ser visto na Figura 12, o veneno de *B. jararacussu* apresenta suas principais frações protéicas distribuído em toda a faixa de pH da fita utilizada e apresenta parte de suas proteínas na região básica, nos pesos moleculares aproximados de 47, 40, 29 e 15 kDa. Na região ácida, chama atenção as proteínas nas faixas de peso em torno de 66, 56 e 16 kDa. Vale ressaltar que, pelo exposto, as proteínas que focalizaram, principalmente na região de pH básico, sugerem ter propriedades bioquímicas distintas, comparada com o veneno de *B. jararaca*, visto que este último é constituído de proteínas na sua maioria de pI ácido.

5.2.2 - Análise da Antigenicidade do veneno de *B. jararacussu*.

Com a padronização da condição ideal para se fracionar o veneno de *B. jararacussu* utilizando 2D-PAGE, o passo seguinte foi avaliar a imunogenicidade deste veneno frente aos soros anti – venenos homólogos e heterólogos. Para tal, o experimento seguiu basicamente três etapas : A primeira, que constituiu o fracionamento do veneno por 2D SDS-PAGE em gel de 7cm; A segunda, que constituiu na transferência das proteínas do gel para membrana apropriada e por último foram realizados imunoblottings com as referidas membranas frente ao soro homólogo e heterólogo. Para padronização desta técnica, a melhor condição para a transferência, tanto das frações de baixo e alto peso molecular foi utilizando membranas de PVDF (0,45 µm) e um tempo para transferência de 2:30 hs sob uma corrente de 200 mA.

Como pode ser visto na Figura 13, os soros anti-jararaca e anti-jararacussu foram bem eficientes no reconhecimento do veneno de *B. jararacussu* por esta técnica. No entanto, utilizando esta metodologia, foi possível identificar questões importantes sobre este veneno e serão apresentadas em tópicos, a seguir:

- Analisando os resultados de forma comparativa pode-se notar que a maioria das frações do veneno de *B. jararacussu* foram bem reconhecidas por ambos os soros, homólogo e heterólogo. Esses resultados sinalizam para a existência de similaridade estrutural entre a maioria das moléculas destes venenos.

- Na faixa de peso molecular próximo a 30, 66 e 100 kDa, dentro da região de ponto isoelétrico na faixa de pH entre 6 e 8, foram as regiões em que ocorreram um maior reconhecimento das frações do veneno da *B. jararacussu* pelo soro anti-jararaca.
- O soro anti-jararacussu se comportou de forma semelhante ao soro anti-jararaca no reconhecimento das frações na faixa de peso molecular próximo de 30, 66 e 100 kDa. Porém, mostrou um reconhecimento mais amplo da faixa de peso molecular de 30 kDa e pH entre 3 e 8.
- Na região ácida, com pH em torno de 3, o soro anti-jararacussu foi capaz de reconhecer frações com o peso molecular próximo a 100, 60, 45 e 14 kDa. Já o reconhecimento pelo soro anti-jararaca frente a estas frações, não mostrou a mesma intensidade, reconhecendo apenas as frações de peso molecular em torno de 100 kDa (mais fortemente) e um reconhecimento discreto na faixa de 60 kDa. Vale ressaltar que, ainda neste pH e na faixa de peso molecular em torno de 45, 30 e 14 kDa, o soro anti-jararacussu foi capaz de reconhecer, significativamente, mais frações nesta área, quando comparado com o soro anti-jararaca.
- Na região básica, em torno do pH 10, é observado um outro resultado muito importante sobre a imunogenicidade do veneno de *B. jararacussu* e sua reação cruzada com o soro heterólogo anti-jararaca. Comparando-se os resultados mostrados na Figura 13 com o perfil bidimensional deste veneno (Figura 12) pode ser visto que, frações majoritárias do veneno de *B. jararacussu*, principalmente na faixa de peso molecular próximo a 47, 40 29 e 16 kDa, não foram reconhecidas, nem pelo soro homólogo como pelo soro heterólogo e, na região próxima a 100 kDa, o soro heterólogo reconheceu mais intensamente frações nesta região, comparado com o reconhecimento pelo soro homólogo.

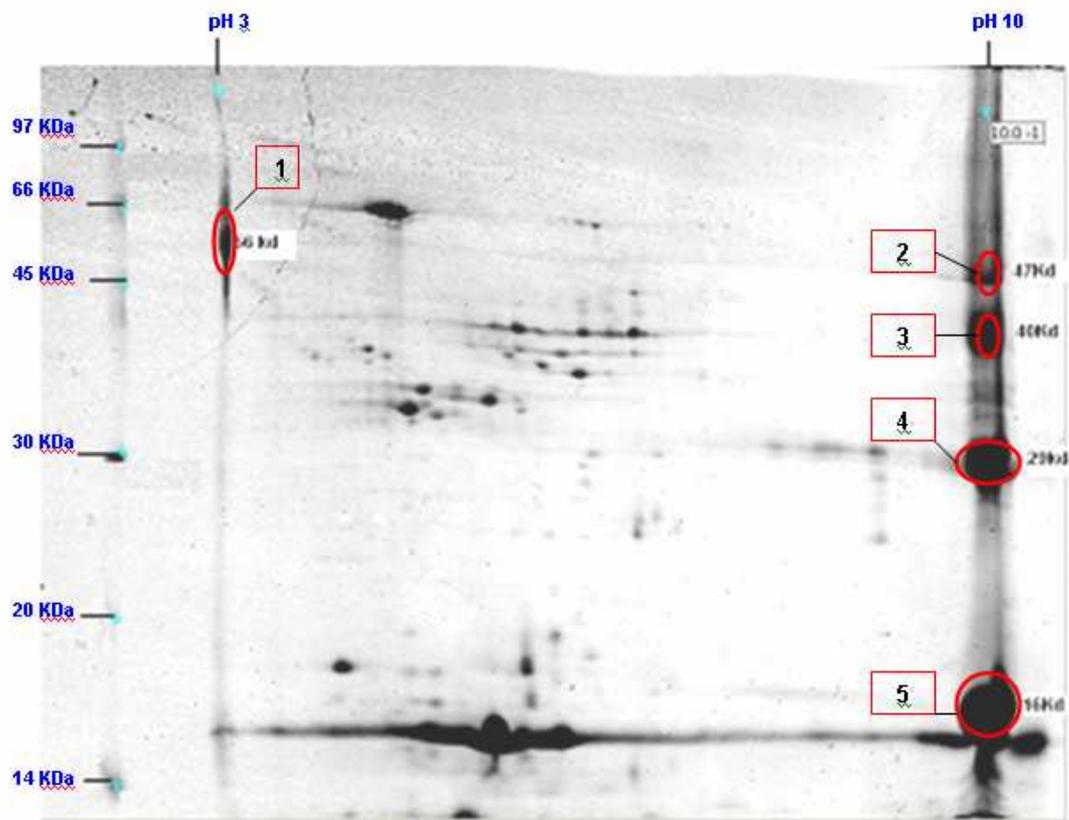
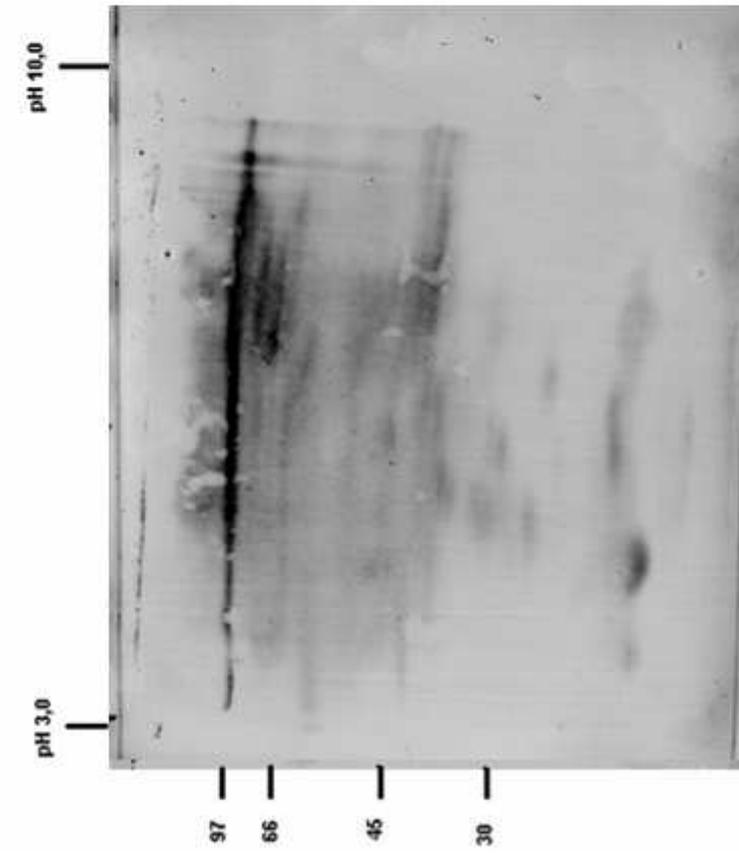


Figura 12: 2D-PAGE do veneno de *B. jararacussu* pH 3-10 com DTT.

O pool de veneno de *B. jararacussu* (1,8 mg) foi analisado por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Na primeira dimensão, as proteínas do veneno foram submetidas a fracionamento utilizando-se fitas de 18 cm e uma faixa de pH entre 3 e 10. Em seguida, as proteínas focalizadas em seus respectivos pI foram separadas em SDS-PAGE 15%, sob condições redutoras. O padrão de peso molecular e os pontos extremos de pH estão destacados de azul. Nas caixas brancas estão marcados os pesos moleculares determinados para as proteínas destacadas. As proteínas marcadas de 1-5 foram selecionadas para hidrólise e identificação.

A) Veneno de jararacuçu X soro anti-jararaca



B) Veneno de jararacuçu X soro anti-jararacussu

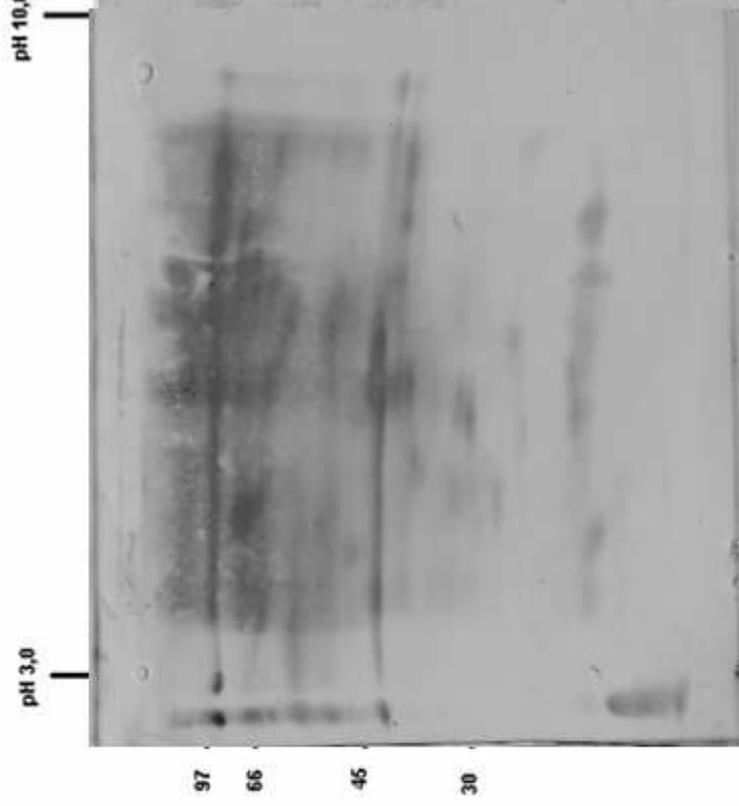


Figura 13: Immunoblotting do veneno de *B. jararacussu*.

O pool de veneno de *B. jararacussu* (200 µg) foi fracionado por 2D-PAGE sob condições não redutoras, utilizando-se na primeira dimensão fitas de 7,3 cm e faixa de pH de 3 a 10 e na segunda dimensão gel de poliacrilamida de 15%. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e incubadas com soro anti-jararaca (A.) e anti-jararacussu (B) na diluição de 1:1000. O padrão de peso molecular e os pontos extremos de pH estão destacados.

Com esta abordagem foi possível identificar frações do veneno de *B. jararacussu* reconhecidas somente pelo soro homólogo, indicando um potencial biomarcador para estas moléculas, como também, identificando frações pouco imunogênicas, não reconhecidas por ambos os soros, mostrando que provavelmente sejam estas moléculas as responsáveis pela má neutralização deste veneno pelo soro antitoxinotrópico comercial.

5.2.3 - Mapeamento do veneno de *B. jararacussu* quanto à similaridade imunológica com o veneno de *B. jararaca*.

Com base nos resultados anteriores, o veneno de *B. jararacussu* foi caracterizado quanto a similaridade imunológica com o veneno de *B. jararaca*. Para tal, foram levados em consideração, principalmente os resultados do imunoblotting, obedecendo aos seguintes parâmetros: Quanto melhor o reconhecimento das frações do veneno de *B. jararacussu* pelo soro anti-jararaca, maior a similaridade entre estas frações e as do veneno de *B. jararaca* e quanto maior o reconhecimento das frações do veneno de *B. jararacussu* pelo soro homólogo, maior é a imunogenicidade das mesmas. Assim, como pode ser visto na Figura 14, as imagens das Figuras 11 e 12 foram correlacionadas e de acordo com as diferenças nos perfis imunológicos as frações foram agrupadas e identificadas como segue:

- **Região imunogênica e de similaridade alta:** É aquela em que houve um alto reconhecimento das frações do veneno de *B. jararacussu* pelo soro homólogo e heterólogo;
- **Região imunogênica e de similaridade média:** É aquela em que houve um reconhecimento, alto ou discreto, das frações do veneno de *B. jararacussu* pelo soro homólogo e um reconhecimento discreto pelo soro heterólogo.
- **Região imunogênica de similaridade baixa:** É aquela em que houve um reconhecimento, alto ou discreto, das frações do veneno de *B.*

jararacussu pelo soro homólogo e não houve reconhecimento pelo soro heterólogo.

- **Região pouco imunogênica e de alta similaridade:** É aquela em que houve um reconhecimento, alto ou discreto, das frações do veneno de *B. jararacussu* pelo soro heterólogo e não houve reconhecimento pelo soro homólogo.
- **Região pouco imunogênica e de baixa similaridade:** É aquela em que não houve reconhecimento das frações do veneno de *B. jararacussu* pelos soros homólogo e heterólogo.

Como pode ser visto na Figura 14, nas regiões marcadas em amarelo e vermelho estão contidas frações do veneno de *B. jararacussu* que apresentam pouca homologia com frações do veneno de *B. jararaca*, visto que a reação cruzada conferida pelo soro anti-jararaca foi baixa. Assim, estas regiões foram eleitas para serem mais bem avaliadas e as proteínas nelas presente, identificadas.

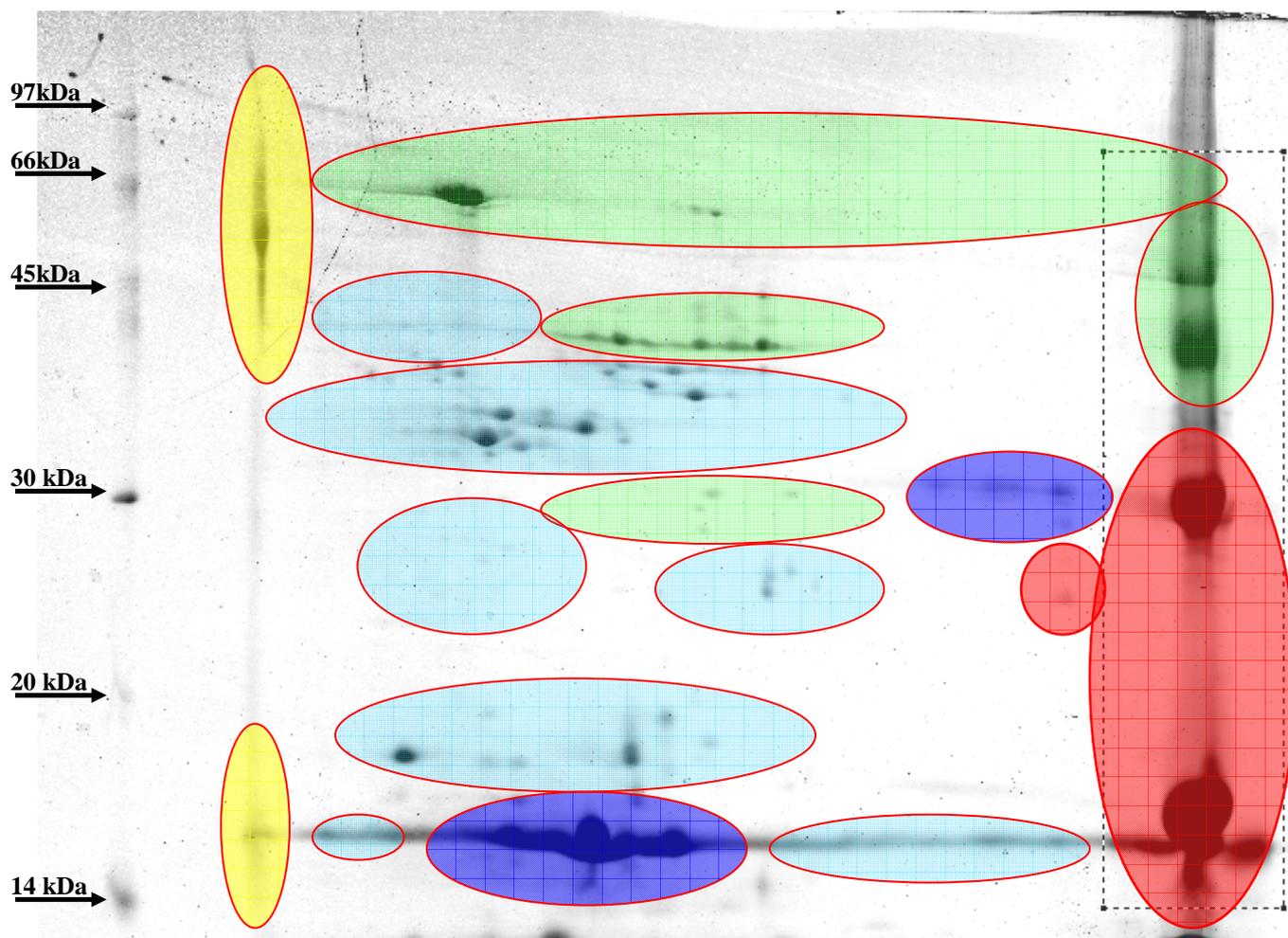


Figura 14: Mapa de similaridade imunológica do veneno de *B. jararacussu*.

Baseado no reconhecimento conferido pelos soros anti-jararaca e anti-jararacussu, vistos por imunoblotting, foram destacadas as regiões de similaridade imunológica do veneno de *B. jararacussu* com o de *B. jararaca*. As regiões destacadas no gel bidimensional do veneno de *B. jararacussu* foram delimitadas de acordo com o grau de similaridade imunológica entre os referidos venenos e apresentadas em esquemas de cores, seguindo a legenda abaixo:

- Região de similaridade alta
- Região de similaridade média
- Região de similaridade baixa
- Região pouco imunogênica e de alta similaridade
- Região pouco imunogênica e de baixa similaridade

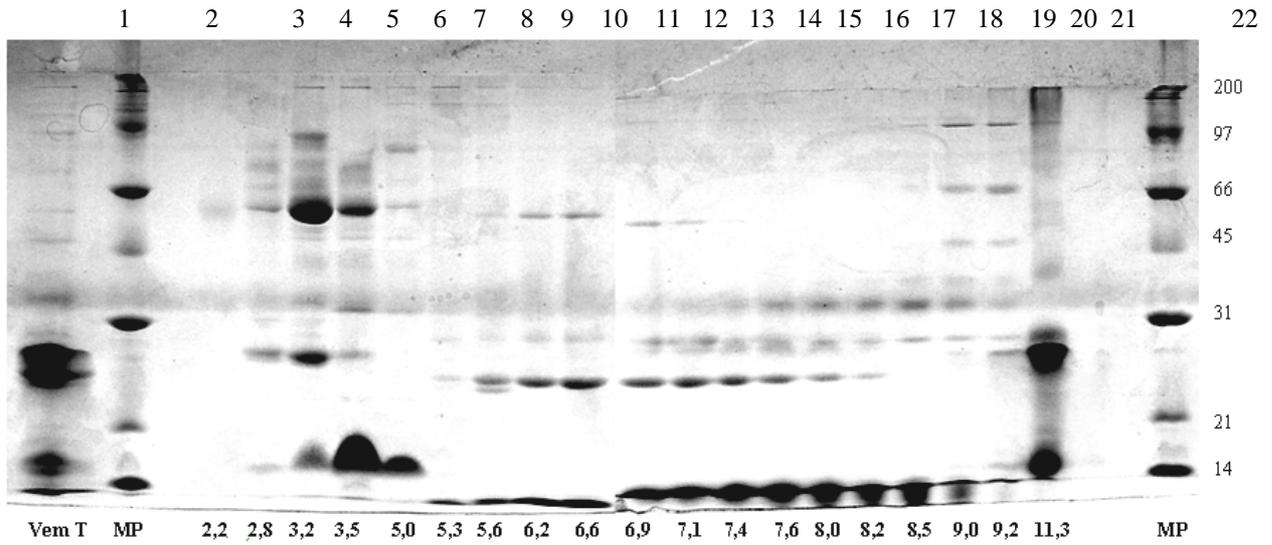
5.3 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES COM POTENCIAL BIOMARCADOR DO VENENO DE *B. JARARACUSSU*.

Estando definidas as regiões do veneno de *B. jararacussu* que apresentaram baixa homologia com o veneno de *B. jararaca*, o próximo passo foi identificar com mais precisão, quais eram as frações determinantes deste resultado. Para tal, o veneno de *B. jararacussu* foi fracionado utilizando-se dois métodos de purificação, com princípios técnicos distintos. Os detalhes destes experimentos serão apresentados a seguir:

5.3.1 - FRACIONAMENTO DO VENENO DE *B. JARARACUSSU* POR ISOELETROFOCALIZAÇÃO E ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE POR IMUNOBLOTTING.

A fim de purificar as frações de ponto isoelétrico extremos, no pH ácido e básico, foi utilizada a técnica de cromatografia por focalização isoelétrica, que separa as moléculas protéicas por diferença no ponto isoelétrico. Como pode ser visto na Figura 15 os resultados da purificação por isoeletrofocalização, mostraram muita similaridade com o perfil deste veneno determinado anteriormente por bidimensional (Figura 12), principalmente para as frações de pI extremos (pH 3 e 10, respectivamente). No tubo 1 (Figura 15) a fração mais ácida do veneno de *B. jararacussu* focalizou com o pI próximo do pH 2,2 e mostrou uma banda única quando analisada por SDS-PAGE. A esta fração foi dado o nome de *Bjssu-pI2,2*. Esta molécula chama atenção, pois se encontra na região de baixa similaridade com o veneno de *B. jararaca*. Seguindo esta etapa de purificação, a *Bjssu-pI2,2* foi submetida a uma gel filtração para avaliação da pureza desta amostra. Como pode ser visto na Figura 16, utilizando a isoeletrofocalização foi possível isolar esta fração, em apenas uma etapa de purificação.

(A)



(B)

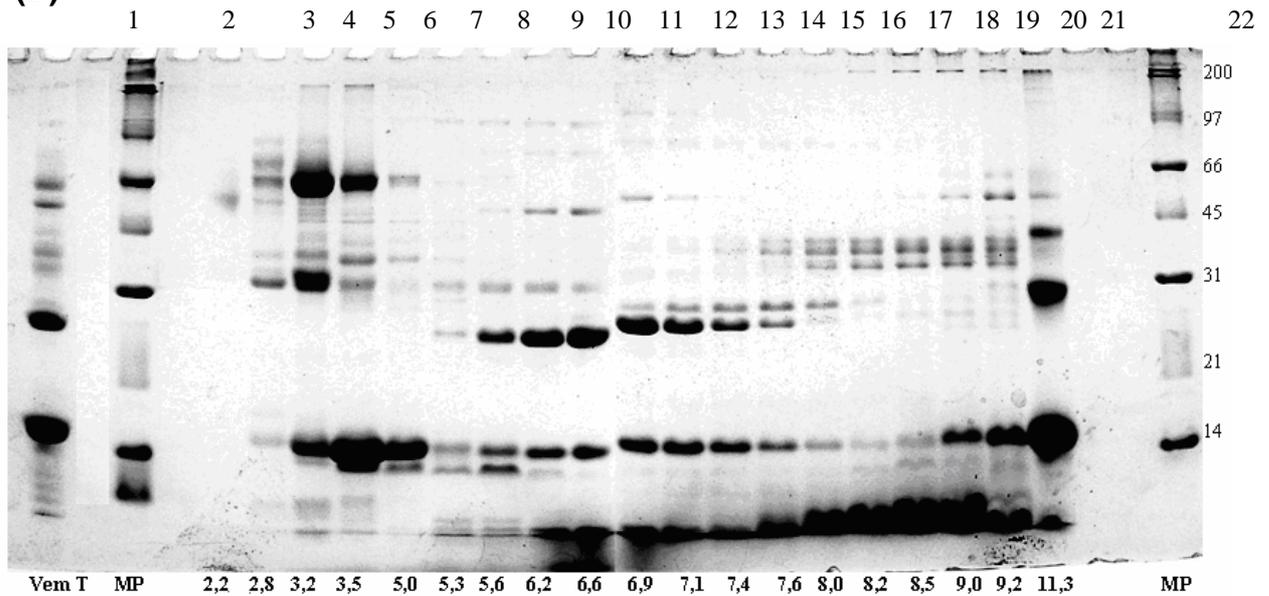


Figura 15: Fracionamento do veneno de *B. jararacussu* por isoeletrofocalização (Rotofor cell).

O veneno de *B. jararacussu* foi fracionado primeiramente por isoeletrofocalização seguido de uma SDS-PAGE 15%, sob condições não redutoras (A) e redutora (B). Em (1) veneno total de *B. jararacussu* (Vem T), em (2 e 22) migração dos marcadores de massa molecular identificados a esquerda. De 3 a 21 isoeletrofocalização do referido veneno com os respectivos pH indicados abaixo.

Proteína Ácida

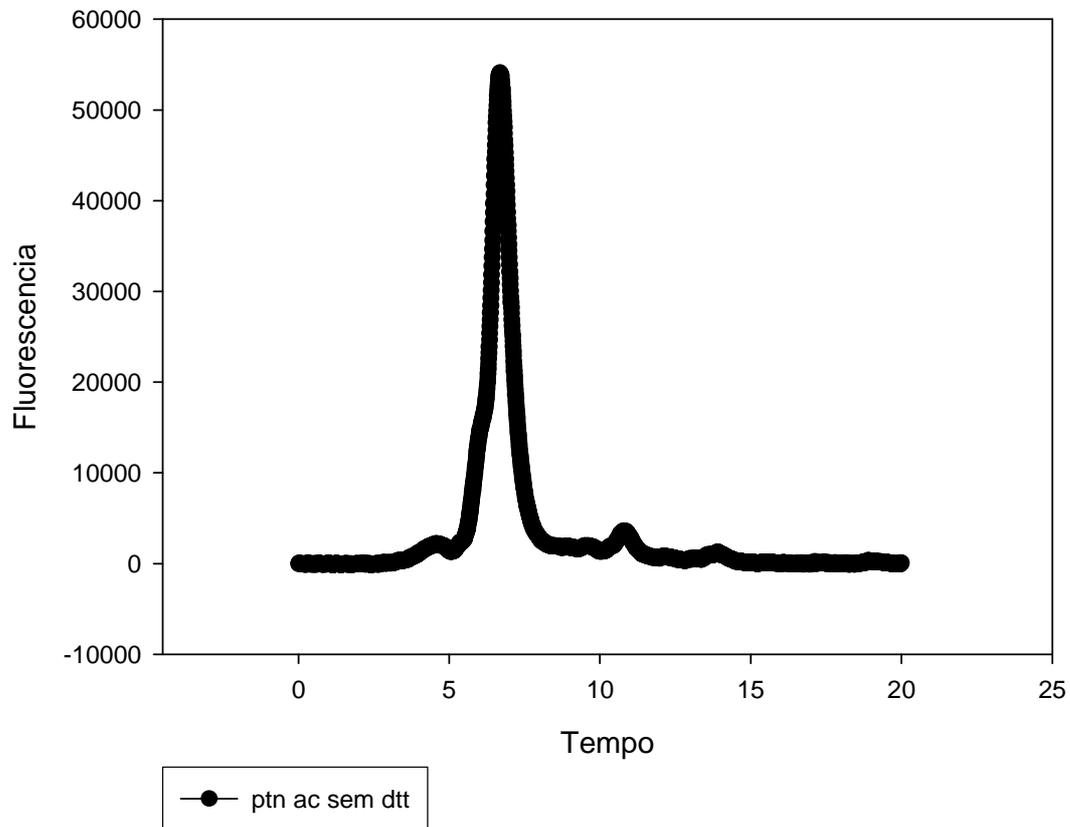


Figura 16: Análise por gel filtração da pureza da proteína Bjsu pI2,2.

A amostra eluída no pH 2,2 do Rotofor Cell foi avaliada quanto ao seu grau de pureza utilizando-se uma coluna de gel filtração (TSK-GEL) de 30cm X 7,8mm, acoplada a um sistema de HPLC, contendo detectores de absorvância e fluorescência (Shimadzu, Japão). O sistema foi equilibrado com tampão Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 em um fluxo de 1 mL/min. O volume de amostra aplicada na coluna foi de 50 µl. A eluição das amostras foi monitorada pela fluorescência em 330 nm (com excitação fixa em 280 nm).

Algumas frações da isoelectrofocalização foram selecionados para análise por *immunoblotting* frente aos soros anti-jararaca e anti-jararacussu (proteínas eluídas nos pHs 2.2, 3.2, 5.8, 6.9, 9.2 e 11,3). Como pode ser visto nas Figuras 17, algumas proteínas chamam atenção por não serem reconhecidas pelo o soro homólogo. Dentre estas, valem ser destacadas as de peso molecular em torno de 14 kDa nos pH 3.2, 6.9 e 9.2; em torno de 27 kDa no pH 3.2 e 30 kDa no pH 5.8. No pH de eluição 11.3, pode ser novamente conferido que as frações de pI acima de 10 não são reconhecidas pelo soro homólogo, corroborando com os resultados obtidos por bidimensional. Outro ponto importante sobre o reconhecimento de frações do veneno de *B. jararacussu* pelo soro homólogo pode ser visto na Figura 18. O soro anti-jararacussu somente foi capaz de reconhecer a *Bjssu-pI2,2* quando analisada sob condições não redutoras.

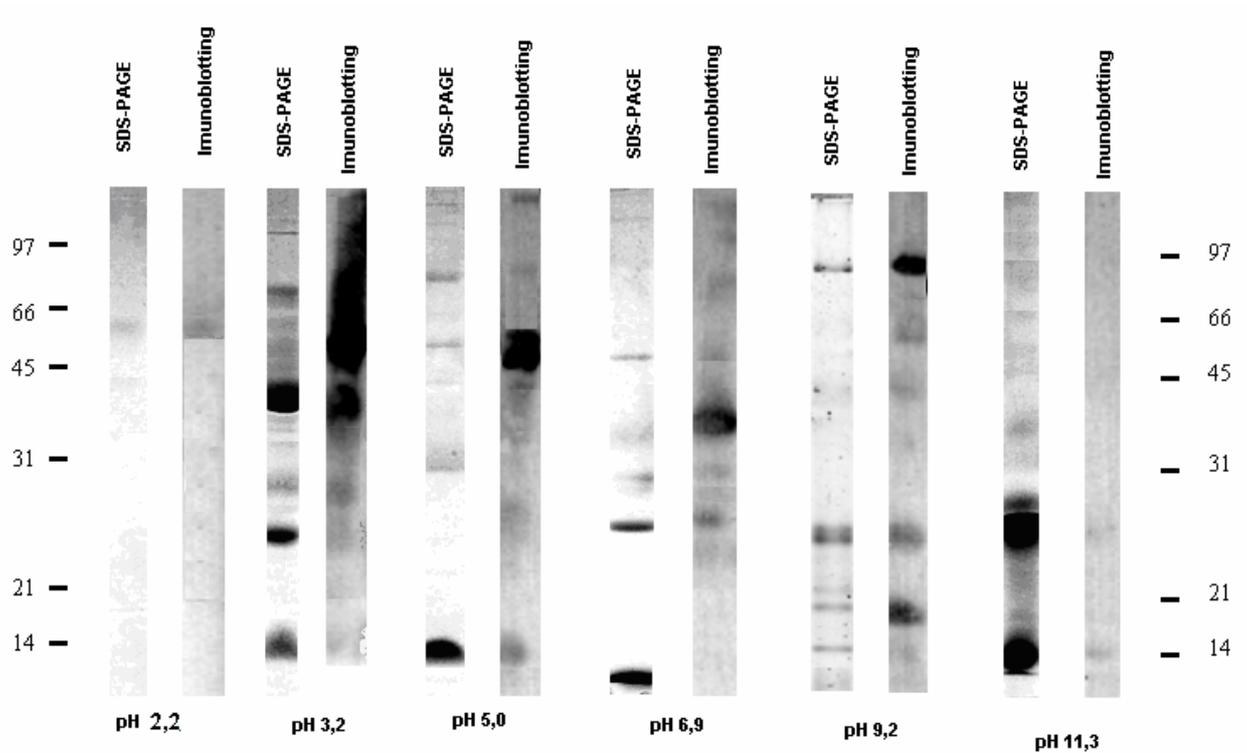


Figura 17: Immunoblotting das frações do veneno de *B. jararacussu* purificadas por isoeletrofocalização.

Após fracionamento do veneno de *B. jararacussu* por isoeletrofocalização, 10µg das amostras que apresentaram os perfis eletroforéticos mais representativos foram selecionados e analisados por imunoblotting, sob condições não redutoras, frente ao soro anti-jararacussu (1:1000). Na parte inferior da figura estão destacados o pH de eluição das amostras selecionadas. Os números nas laterais indicam a migração dos marcadores de massa molecular (kDa).

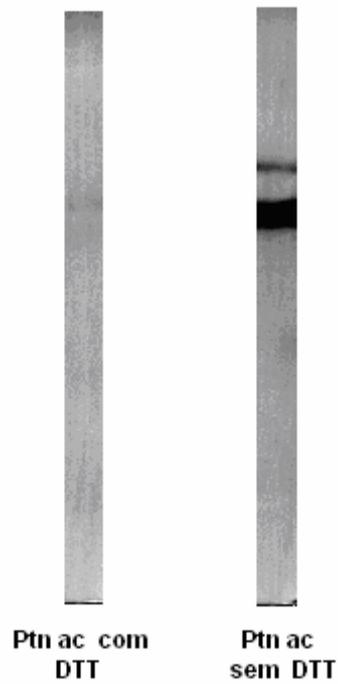


Figura 18: Immunoblotting da proteína de pl ácido.

A *Bjssu-pl2,2* foi avaliada quanto ao reconhecimento pelo soro anti-jararacussu sob condições redutoras e não redutoras. Neste experimento, 5 μ g da *Bjssu-pl2,2* submetido a SDS-PAGE e transferido para PVDF. Em seguida, a membrana foi incubada com soro anti-jararacussu na diluição de 1:1000 e revelada com Kit de detecção para imunoblotting (Bio Rad®).

5.3.2 - FRACIONAMENTO DO VENENO DE *B. JARARACUSSU* POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO.

Os resultados anteriores mostraram que as frações de pl ácido do veneno de *B. jararacussu* e, principalmente as de alto peso molecular, foram diferentemente reconhecidas pelos soros homólogos e heterólogos. Assim, os experimentos seguintes tiveram o objetivo de observar melhor a reação cruzada das frações de alto peso do veneno de *B. jararacussu* frente aos referidos soros. Assim o veneno de *B. jararacussu* foi fracionado numa resina de Sephacryl S-200 (2,6 X 100 cm)

Como pode ser visto na Figura 19, no pico 1 da gel filtração foi eluída as frações de peso molecular acima de 30 kDa. Para estas frações foi denominado de pool 1 do veneno de *B. jararacussu* (Figura 19C). O pool 1 foi avaliado por SDS-PAGE 1D e 2D como pode ser visto nas Figuras 20 e 21 respectivamente. Comparando os géis 2D do veneno total (Figura 12) com e do pool 1 (Figura 21) é constatado o aparecimento de alguns spots, antes não detectados no veneno total. Esse fato se dá, visto que por essa abordagem foi possível analisar somente as frações de alto peso, permitindo que frações minoritárias deste veneno fossem visualizadas. A esta abordagem dá-se o nome de subproteoma.

Em seguida, o pool 1 do veneno de *B. jararacussu* foi fracionado por SDS-PAGE e 2D-PAGE e analisado por imunoblotting. Tanto o soro homólogo como o heterólogo mostrou um bom reconhecimento das referidas frações fracionadas por SDS-PAGE (Figura 20) se destacando apenas o fato de que nas amostras analisadas em condição redutora, pôde ser detectado a dissociação de um oligômero e o aparecimento de duas bandas de peso molecular próximo a 14 kDa, que são reconhecidas pelo soro heterólogo e não reconhecidas pelo soro homólogo. Já nas análises por “Imunoblotting”, partido do fracionamento por 2D-PAGE (Figura 22), foi possível identificar novas regiões interessantes. Como pode ser visto na Figura 22, na região de pl em torno de 3 foi verificado novamente um maior reconhecimento destas frações pelo soro homólogo, comparado com o

heterólogo. Na Figura 21 é mostrada novas regiões com potencial de conter possíveis biomarcadores do veneno de *B. jararacussu*.

Gel Filtração *B. jararacussu*

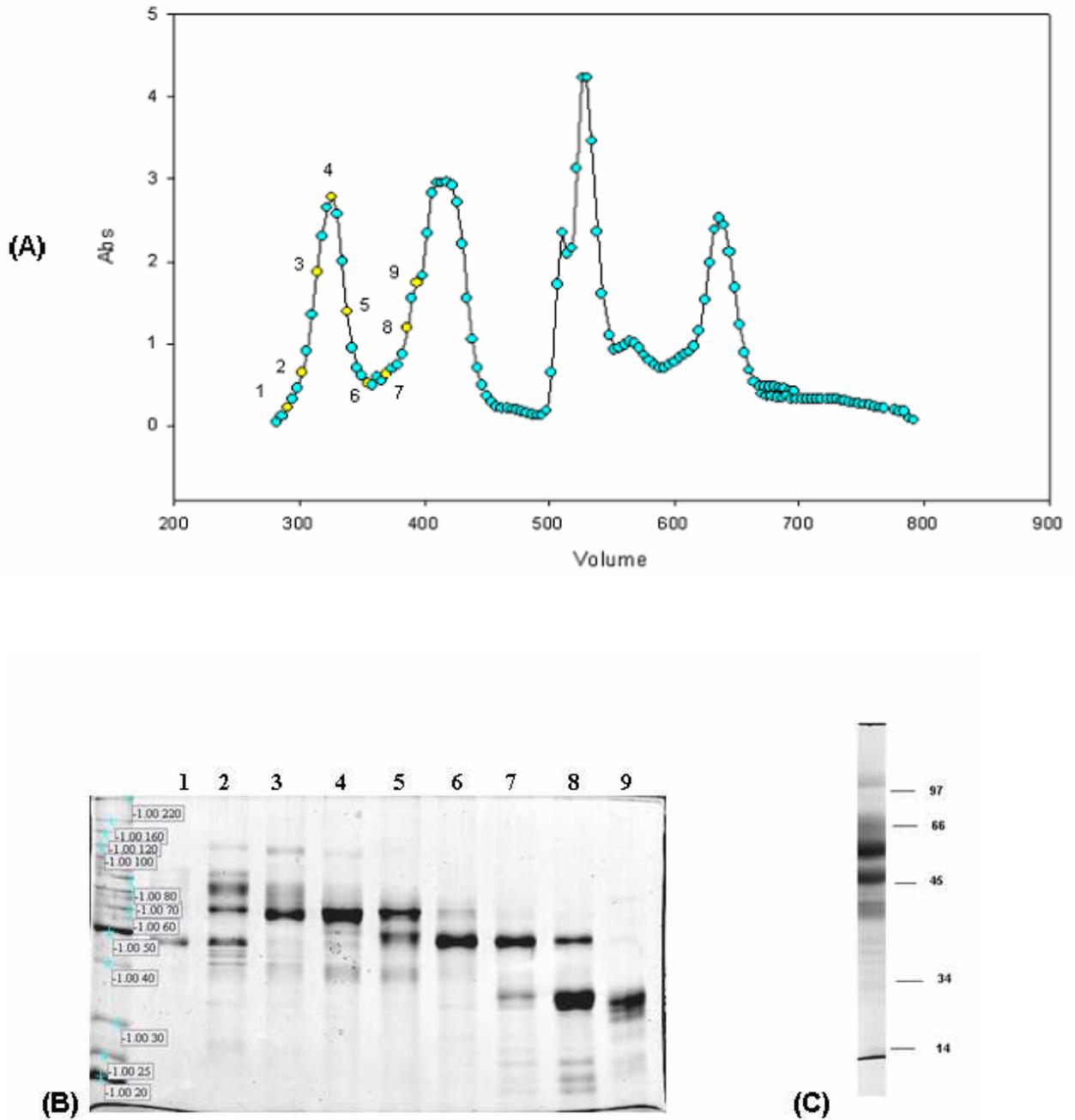


Figura 19: Fracionamento do veneno de *B. jararacussu* por gel filtração.

O veneno (500 mg) foi fracionado por cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-200 HR), como descrito no Material e Métodos. Os pontos em amarelo no gráfico da Figura A foram analisados por SDS-PAGE 15% e apresentados no gel da Figura B, em ordem crescente de absorvância (de acordo com os números de 1 a 9 apresentados no gráfico). Para cada ponto analisado no gel foi utilizado 20 μ g de proteína. A marcação em vermelho no gráfico (A) determina o ponto final de coleta dos tubos para o pico 1. Em (C) o perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) do pico 1 (20 μ g).

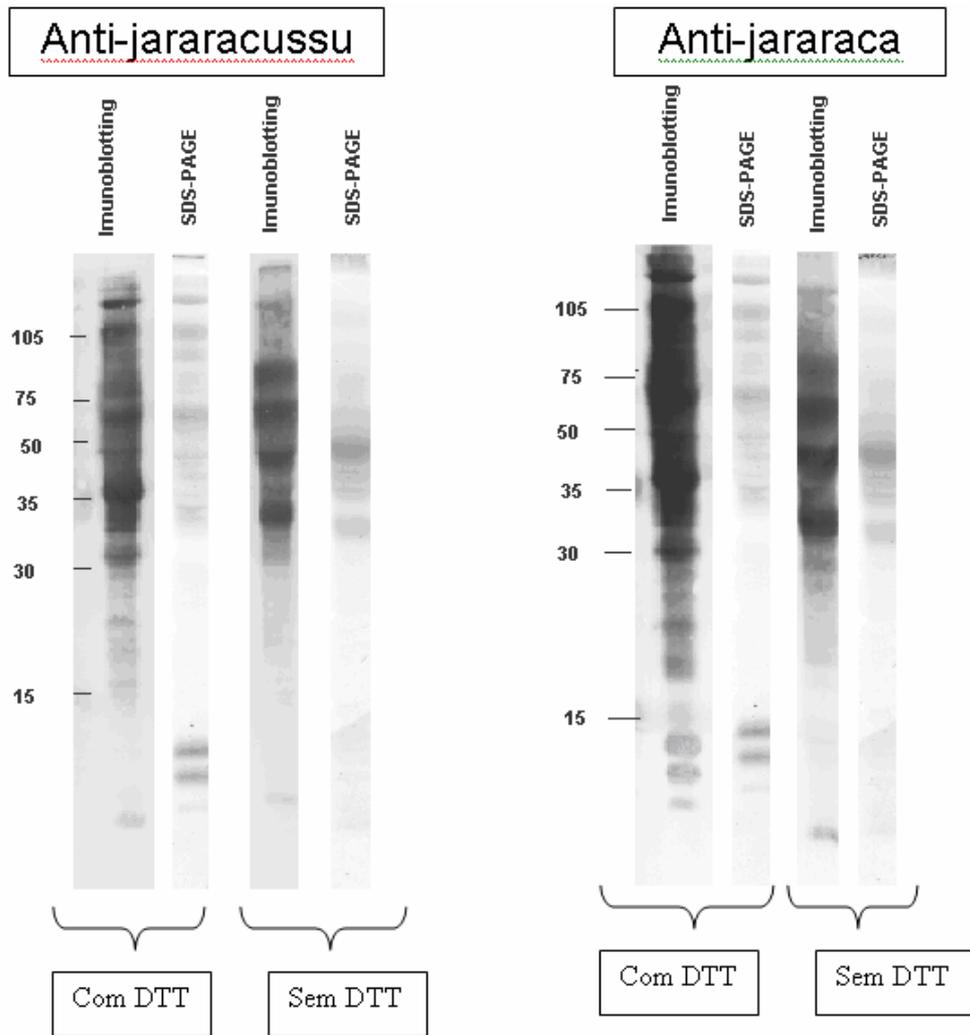


Figura 20: Imunoblotting frações de alto peso *B. jararacussu*

As frações eluídas no pico 1 (Gel filtração) foram fracionadas por SDS-PAGE com gradiente de 8 a 18% e analisadas por imunoblotting. Os números laterais indicam a migração dos marcadores de massa molecular (kDa).

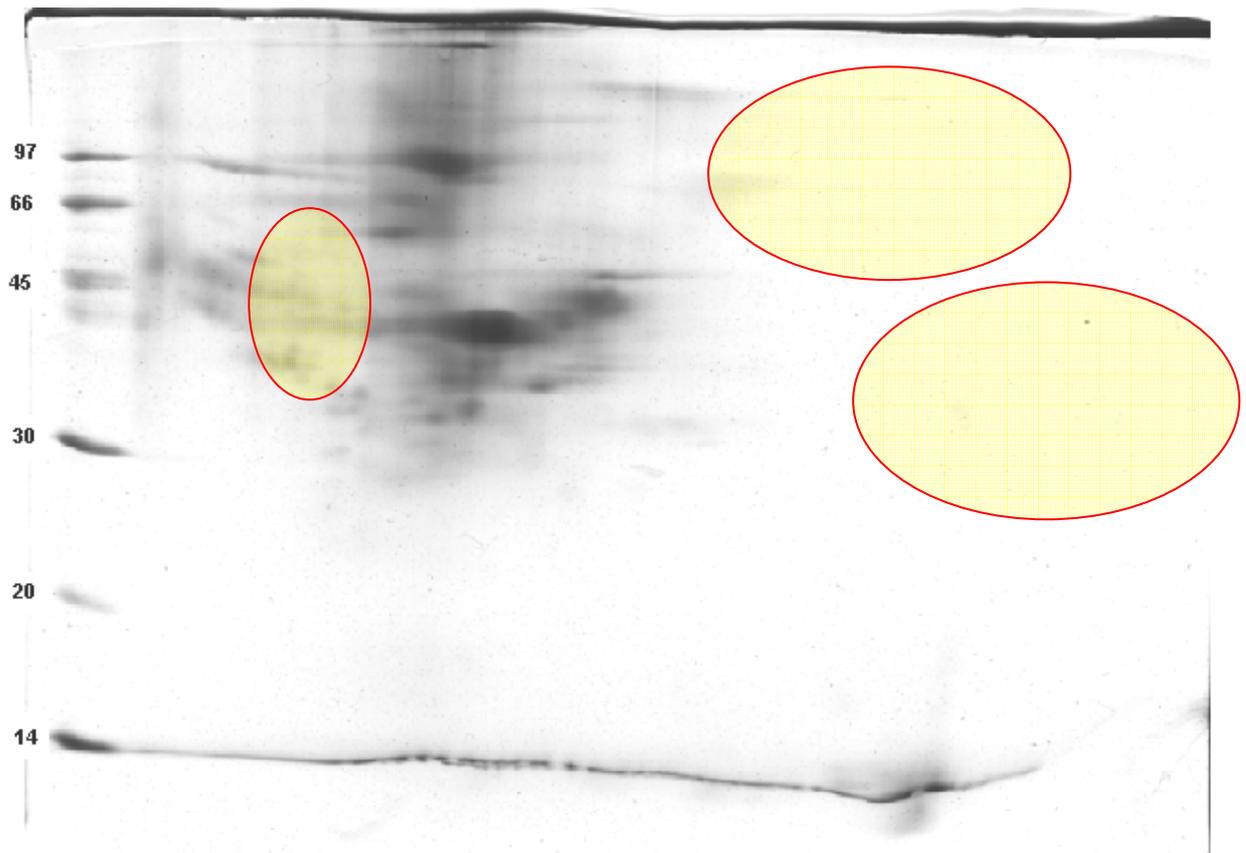


Figura 21: 2D-PAGE frações de alto peso pH 3-10 sem DTT.

As frações de alto peso eluidas no pico 1 (Gel Filtração) foram fracionadas por 2D-SDS-PAGE sob condições não redutoras, utilizando-se na utilizando-se na primeira dimensão fitas de 7 cm e faixa de pH de 3 a 10 e na segunda dimensão gel de poliacrilamida de 15%. Os números na lateral indicam a migração dos marcadores de massa molecular (kDa). Com base no resultado de 2D-imunoblotting (Figura 14) foram destacados em amarelo as regiões com potencial de conter novos biomarcadores para o veneno de *B. jararacussu*.

Anti jararacussu

Anti jararaca

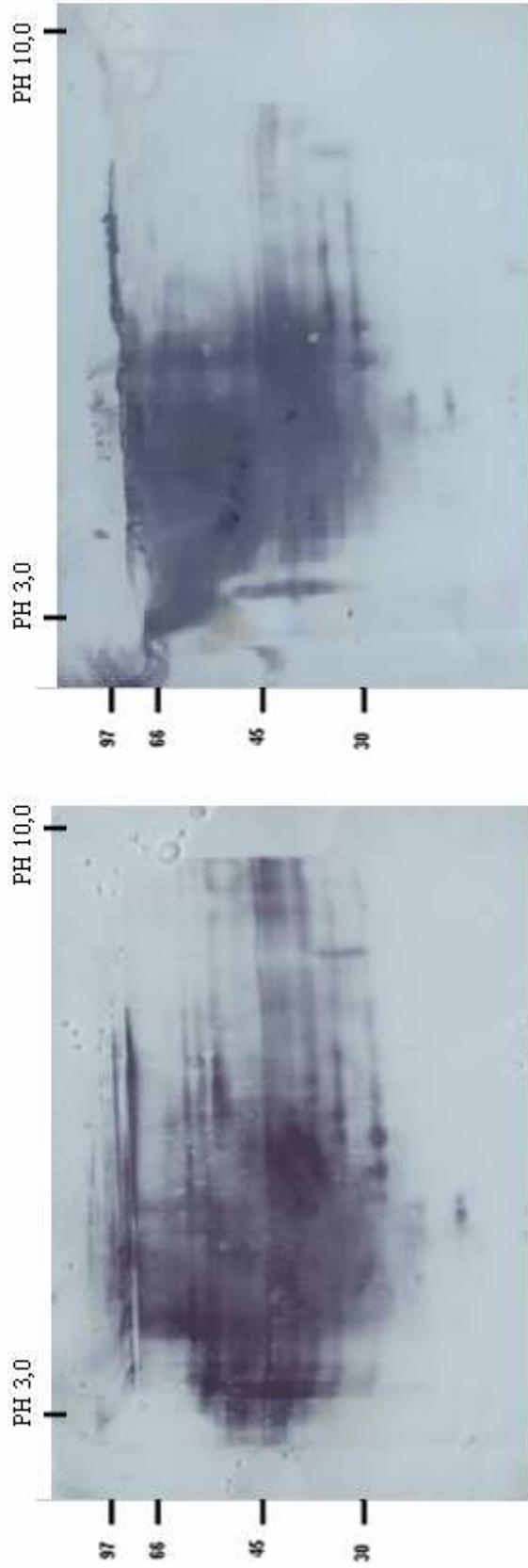


Figura 22: 2D – Imunoblotting das frações de alto peso do veneno de *B. jararacussu*.

O pool 1 do veneno de *B. jararacussu* (100 µg) foi fracionado por 2D-PAGE sob condições não redutoras, utilizando-se na primeira dimensão fitas de 7,3 cm na faixa de pH de 3 a 10 e na segunda dimensão gel de poliacrilamida de 15%. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e incubadas com os soros, anti-jararaca e anti-jararacussu, na diluição de 1:1000.

5.4 – IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADOR DO VENENO DE *B. JARARACUSSU*.

As proteínas selecionadas (Figura 12) foram hidrolisadas em gel e submetidas à identificação por MS/MS. Dos resultados obtidos foi possível identificar as proteínas número 1, 4 e 5 (Figura 12) com uma significância estatística de $p < 0.05$, como pode ser visto na Figura 23. A proteína de pl ácido e peso molecular em torno de 56 kDa (número 1, Figura 12) foi analisada pelo Q-Tof sendo gerado 96 peptídeos para esta molécula. Destes, dois apresentaram similaridade com proteínas do banco de dados (NCBI) permitindo sua identificação. Estes peptídeos foram avaliados quanto a sua homologia, ou com seqüência de proteína, ou com seqüência de nucleotídeos, já depositados em banco de dados, utilizando-se a ferramenta **BLAST network service** (Altschul, 1997). Pôde ser observado, que os dois peptídeos submetidos a análise mostraram alta homologia com a BOTIN, uma serino proteinase do veneno de *Bothrops insularis*. O resultado da similaridade destes peptídeos com as cinco proteínas mais homólogas pode ser visto na Tabela 6 e 7. Estas cinco proteínas mais homólogas foram submetidas a um alinhamento e, como pode ser visto na Figura 24, o peptídeo **RSVANDDEVIRY** é bem conservado na BOTIN e Bothrombin com 100% de homologia e na BthaTI (fragmento de serino proteinase de *B. alternatus*) há uma substituição de uma prolina por uma alanina. Porém, este peptídeo teve uma homologia baixa nesta região com a PA-BJ e Stejnobin. Já o peptídeo **RKPALYTKV** é bem conservado na Pa-BJ, Stejnobin e BOTIN, apresentando uma substituição de fenilalanina por uma leucina na Bothrombin. Porém, apresentou baixa homologia frente a BthaTI.

As proteínas de pl básico e peso molecular em torno de 16 e 29 kDa (número 4 e 5, Figura 12) foram identificadas por MS/MS (MALDI Tof-Tof) sendo gerado 29 e 30 peptídeos para estas moléculas, respectivamente. A proteína de 29 kDa foi identificada também como uma serino proteinase da família das trombinas símile. O peptídeo pelo qual foi possível a identificação da proteína (RFLVALYTSRS) foi avaliado quanto a sua similaridade pela ferramenta BLAST e como pode ser visto na Tabela 8, apresentou 100% de homologia com serino protease de *B. jararacussu*. A proteína de 16 kDa foi

identificada como Bothropstoxina-I uma PLA₂ considerada como a principal miotoxina do veneno de *B. jararacussu*.

Tabela 6: Análise de Similaridade do peptídeo RSVANDDEVIRY. Utilizando a ferramenta BLAST, as seqüência peptídicas geradas por MS/MS (Q-tof) da proteína Bjssu-pl2,2 e que mostraram similaridade com a BOTIN, foram analisados separadamente quanto a similaridade de seqüência primária frente as proteínas do banco de dados (NCBI).

Análise de Similaridade do peptídeo RSVANDDEVIRY					
Proteína	Registro	No resíduos	Espécie	Referência	homologia
BOTIN	Q8QG86	257AA	<i>B. insularis</i>	Seqüência de Nucleotídeo	100
VSPA-BOTJA Bothrombin	P81661	232AA	<i>B. jararaca</i>	Seqüência de proteína	100
BOTJA	Q5W960	255AA	<i>B.jararaca</i>	Seqüência de Nucleotídeo	83
	Q5W958	253AA			
Q6IWF1_9SAU R (BthaTI)	Q6IWF1	233AA	<i>B. alternatus</i>	Seqüência de Nucleotídeo	83

Tabela 7: Análise de Similaridade do peptídeo RKPALYTKV. Utilizando a ferramenta BLAST, as seqüência peptídicas geradas por MS/MS (Q-tof) da proteína Bjssu-pl2,2 e que mostraram similaridade com a BOTIN, foram analisados separadamente quanto a similaridade de seqüência primária frente as proteínas do banco de dados (NCBI).

Análise de Similaridade do peptídeo RKPALYTKV					
Proteína	Registro	No resíduos	Espécie	Referência	homologia
BOTIN	Q8QG86	257AA	<i>B. insularis</i>	Seqüência de Nucleotídeo	100
Q8AY81-TRIST Stejnobin	Q8AY81	260AA	<i>T. stejnegeri</i>	Seqüência de Nucleotídeo	100
VSP1-BOTJA PA-BJ	P81824	232AA	<i>B. jararaca</i>	Seqüência de Proteína	100

Tabela 8: Análise de Similaridade do peptídeo RFLVALYTSRS. Utilizando a ferramenta BLAST, a seqüência peptídica gerada por MS/MS (MALDI tof-tof) da serino proteinase de pl básico identificada neste trabalho, que foi importante para a identificação desta proteína, foi analisado quanto a similaridade de seqüência primária frente as proteínas do banco de dados (NCBI).

Análise de Similaridade do peptídeo RFLVALYTSRS			
Código NCBI	Proteína	Espécie	Homologia
Q8UVX1	Thrombin-like serine protease	<i>Agkistrodon caliginosus</i>	100%
Q8UUJ2	Thrombin-like enzyme ussurin (Fragment)	<i>Agkistrodon caliginosus</i>	100%
Q7T229	Serine protease	<i>Bothrops jararacussu</i>	100%
VSP2	Pallabin-2 precursor	<i>Agkistrodon halys</i>	100%
VSP1_AGKHP	Pallabin precursor	<i>Agkistrodon halys</i>	100%

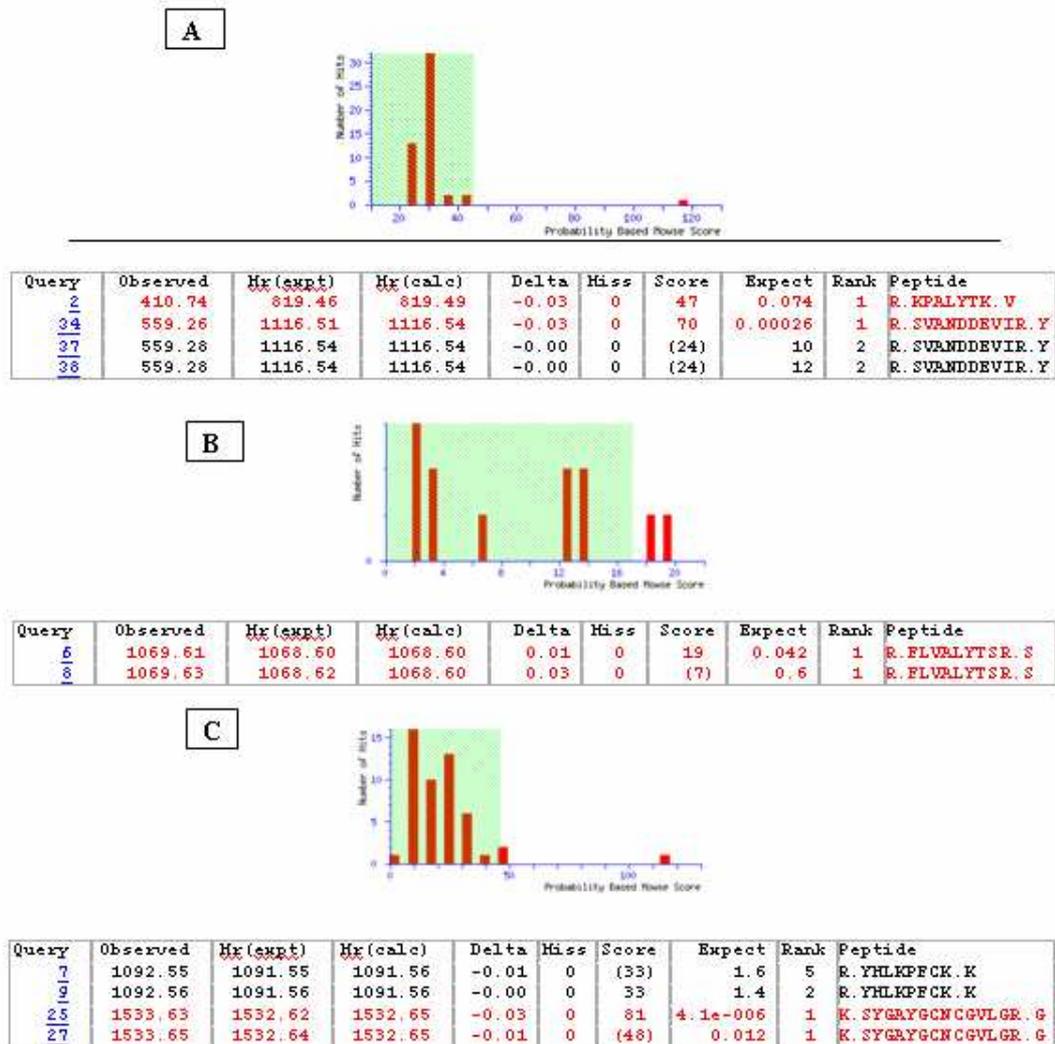


Figura 23: Identificação das frações selecionadas do veneno de *B. jararacussu*.

Após tripsinização das frações do veneno de *B. jararacussu*, os peptídeos gerados foram analisados por Q-tof (MS-MS) (A) e MALDI ToF-ToF (B e C) e identificados pela interface do programa MASCOT. Em A, a proteína de pI ácido (número 1 da figura 12) foi identificada como tombina símile, a partir dos dois peptídeos destacados em vermelho. Em B e C, as proteínas de pI básico (número 4 e 5 da figura 12) foram identificadas como uma serino proteinase e Fosfolipase A2 (Miotoxina), respectivamente, a partir dos peptídeos destacados em vermelho.



Figura 24: Alinhamento das cinco proteínas que apresentaram maior homologia com os peptídeos da identificação da Bjsu.p12.2.
 O alinhamento é apresentado em ordem crescente de similaridade. OS códigos na barra esquerda da figura se referem a: BOTIN (Q8QG86 - serino proteinase de *B. insularis*); Bothrombin (P81664 - serino proteinase de *B. jararaca*); Batha1 (Q61WV1 - serino proteinase de *B. alternatus*); PA-BJ (P81824 - serino proteinase de *B. jararaca*); Stejnobin (Q8AY81 - serino proteinase de *T. steinegeri*).

5.5 – CARACTERIZAÇÃO DO BIOMARCADOR DO VENENO DE *B. JARARACUSSU*.

A proteína então identificada como sendo uma serino proteinase denominada neste trabalho de *Bjssu-pl2,2* foi caracterizada quanto a atividade enzimática. Também foi avaliado a quantidade de estrutura secundária e a fluorescência de triptofano. Por questões didáticas, os resultados serão apresentados em tópicos como segue:

5.5.1 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA – Como a *Bjssu-pl2,2* apresentou homologia com trambina-simile, o próximo passo foi avaliar sua atividade proteolítica. Como pode ser visto na Figura 25, a *Bjssu-pl2,2* foi capaz de clivar BApNA, confirmando sua atividade proteolítica.

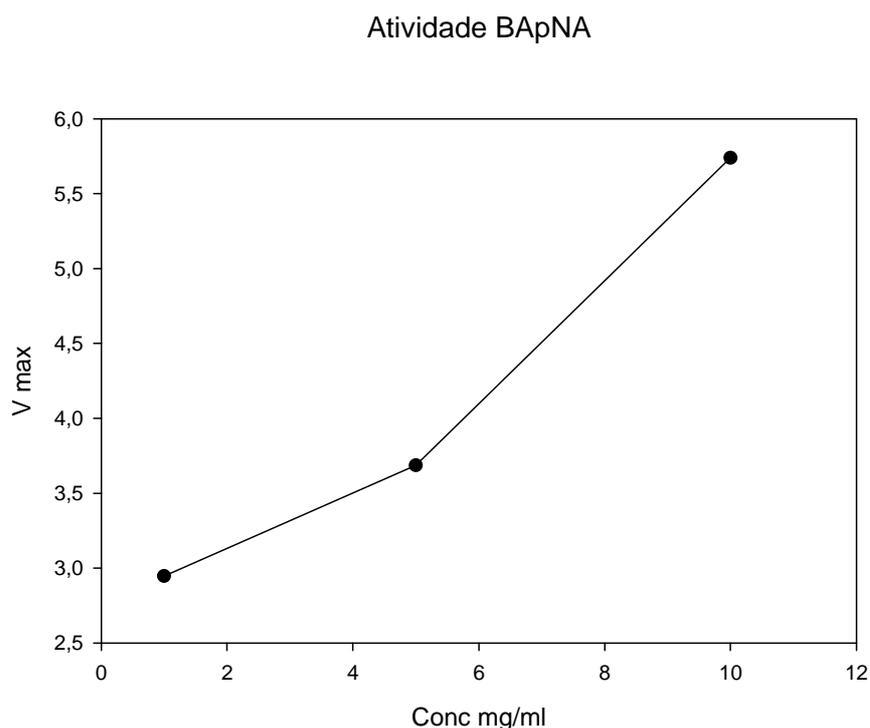
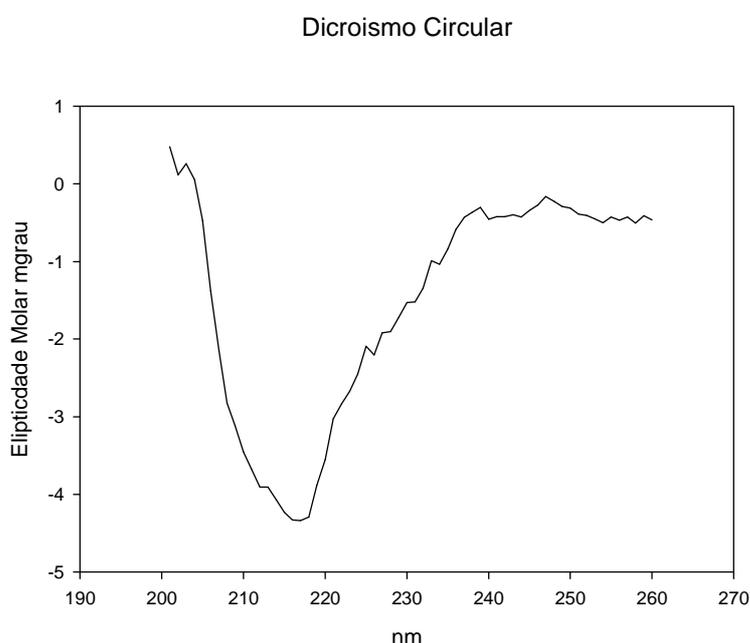


Figura 25: Atividade Amidolítica (BapNA) da preteína Bjssu-pl2,2.

A proteína *Bjssu-pl2,2* foi avaliada quanto a sua atividade proteásica. Neste experimento foi monitorada a clivagem do substrato a partir das mudanças na absorbância a 410nm, pelo período de uma hora. A velocidade máxima de clivagem obtida para cada diluição da proteína (0,2, 1,0 e 2,0 μ g) foi plotada no gráfico.

5.5.2 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA – O conteúdo de estrutura secundária da Bjssu-pl2,2 foi avaliada por dicroísmo circular. Como pode ser visto na Figura 26, o espectro apresenta um pico negativo em 218nm, indicando ser uma proteína rica em folha beta. Para calcular de forma mais precisa o conteúdo de estrutura secundária dessa proteína, o espectro foi deconvolvido utilizando-se o programa CDPRO. A partir destes cálculos, observamos que a proteína apresenta cerca de 56% de folha beta, seguido de 21,5% de alças, 15% de estrutura randômica e 7,5% e alfa hélices.



Deconvolução da curva do CD e quantificação de estrutura secundária (Programa CDPRO, pacotes 1, 3, 4 e 7)				
Estrutura	Alfa Hélice	Folha Beta	Voltas	Randômica
Percentagem	7,5%	56%	21,5%	15%

Figura 26: Análise de estrutura secundária da proteína Bjssu-pl2,2.

As análises foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco-715 utilizando um caminho óptico de 1,0mm e cubeta de quartzo. A Bjssu-pl2,2 (0,2mg/mL) foi dialisada em PBS para determinação do espectro. Para a deconvolução da curva do espectro do CD foi utilizado o programa CD PRO, analisado pelos pacotes 1, 3, 4 e 7.

5.5.3 – ESTRUTURA TERCIÁRIA – As análises dos espectros de emissão de fluorescência intrínseca dos resíduos aromáticos (triptofanos e tirosinas) permitem avaliar as características de estrutura terciária e quaternária de proteínas. Os espectros contendo picos máximos de emissão de fluorescência desviados para comprimentos de onda menores e mais energéticos (azul) refletem que os resíduos de aminoácidos aromáticos da proteína em questão estão em ambientes mais apolares, enquanto que picos máximos de emissão de fluorescência mais voltados para comprimentos de onda maiores e menos energéticos (vermelho) refletem que os resíduos aromáticos estão mais expostos ao solvente polar. De um modo geral, resíduos aromáticos em ambientes mais apolar sugerem que a proteína está enovelada e, provavelmente em sua conformação nativa. Resíduos aromáticos mais expostos ao solvente sugerem que a proteína está se desenovelando ou está completamente desenovelada. Com esta abordagem, o enovelamento da proteína *Bjssu-pl2,2* foi então avaliado por fluorescência de triptofano. Como pode ser visto na Figura 27, o espectro de emissão de fluorescência da proteína, quando excitada em 280 nm apresenta um pico máximo próximo a 330nm, sugerindo uma proteína bem enovelada.

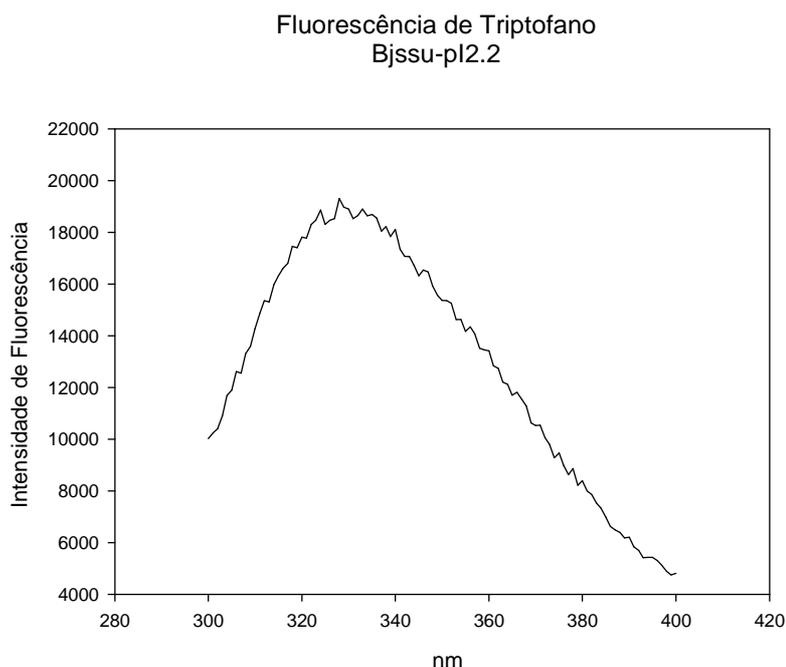


Figura 27: Análise de estrutura terciária da *Bjssu-pl2,2*

As medidas espectroscópicas foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS K2. A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada de Xenônio de 300 watts e fendas de 2mm para excitação e 1mm para emissão. A *Bjssu-pl2,2* (0,2mg/mL) foi dialisada em PBS e analisada, utilizando-se cubeta de quartzo de 1mL. Os espectros de emissão de fluorescência dos triptofanos foram obtidos excitando-se as amostras a 280nm e coletando a emissão na faixa de 300 a 400nm.

6 – DISCUSSÃO

No Brasil, o tratamento do acidente ofídico causado pela espécie *B. jararacussu* encontra um grande problema que é a necessidade de se diagnosticar precocemente e com exatidão quando um acidente foi produzido especificamente por esta espécie, visto que neste acidente o médico deve adotar uma conduta terapêutica diferenciada, que é a administração do soro antiofídico-crotálico, ao contrário do tratamento indicado para outras espécies do gênero, que é a administração do soro monoespecífico, o antiofídico. O diagnóstico diferencial desta espécie é muito difícil, pois os sinais clínicos no local da picada se confundem com os presentes nos acidentes causados por serpentes de outras espécies do gênero. Isto se deve a similaridade dos efeitos fisiopatológicos, característicos nestes envenenamentos. Apesar de vários autores já terem mostrado que para o acidente causado por *B. jararacussu* o melhor tratamento é a administração do soro antiofídico-crotálico (Brazil 1911; Dos Santos et al., 1992; De Roodt et al., 1998; Oshima-Franco et al., 2001; Beghini et al., 2005), o Ministério da Saúde ainda não indica este soro para o tratamento. Vale ressaltar, que não há estudos epidemiológicos mostrando o número de acidentes causados por *B. jararacussu* no Rio de Janeiro. Além disso nas grandes Cidades deste Estado, não existem serpentes do gênero *Crotalus*. Isto associado ao fato do Ministério da Saúde não indicar o soro antiofídico – crotálico no tratamento do acidente por *B. jararacussu*, leva a não disponibilidade deste soro na grande maioria dos hospitais do Estado.

Assim, um estudo imunológico do veneno de *B. jararacussu*, mostrou ser de grande valia, contribuindo na tentativa de se elucidar questões relacionadas ao acidente causado por esta espécie, fornecendo dados importantes relacionados à neutralização das frações tóxicas deste veneno. Outro ponto importante é que a partir da reatividade cruzada deste veneno frente aos soros anti-jararaca e anti-jararacussu, foi possível a identificação de possíveis moléculas espécie-específica (biomarcadores) deste veneno. Estes dados são úteis, pelo seu potencial de aplicação, tanto na tradicional produção

de soros hiperimunes, objetivando um desenvolvimento de um soro mais eficiente para o acidente causado por esta espécie, como também, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de anticorpos (policlonais ou monoclonais) espécie-específicos como ferramenta para a padronização de um método diagnóstico que discrimine este tipo de acidente.

Apesar da similaridade na atividade tóxica dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, o perfil eletroforético destes venenos são bem distintos, principalmente quando analisados em condições não redutoras, corroborando com os resultados de outros autores (Moura da Silva et al., 1992; Méier, 1986). Quando analisados por “Imunoblotting”, frente aos soros homólogos e heterólogos, várias bandas mostraram reatividade cruzada. Colombini 2003 mostra que os antígenos de maior massa molecular dos venenos de *B. atrox* e *L. m. muta* são mais imunogênicos para os dois venenos. Neste trabalho, pôde ser observado nas análises por “imunoblotting” a partir do fracionamento por 2D-PAGE, que tanto o soro homólogo como o heterólogo mostraram um bom reconhecimento das frações de alto peso do veneno de *B. jararacussu*, mostrando que também neste veneno, estas frações são as mais imunogênicas. Esses dados ainda sugerem, que as frações de alto peso são as que apresentam maior similaridade estrutural entre os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Por outro lado, o soro homólogo foi capaz de reconhecer melhor as frações entre 20 e 45 kDa do veneno de *B. jararacussu*, principalmente na região de pI ácido, sugerindo que esta área apresenta frações com pouca similaridade estrutural, sendo boas candidatas para estudos imunológicos mais precisos, como o mapeamento de epítomos e produção de anticorpos monoclonais como ferramenta para o estudo da especificidade antigênica destas moléculas.

Comparando os pI das proteínas dos venenos estudados (Figura 11), no veneno de *B. jararaca* as frações se concentram na região de pH ácido enquanto que no veneno de *B. jararacussu*, uma boa parte se concentra na região básica. Este fato sugere que as proteínas de pI básico do veneno de *B. jararacussu* são moléculas que apresentam propriedades distintas comparadas as proteínas do veneno de *B. jararaca*, devendo ser melhor estudadas quanto ao potencial biomarcador para este veneno. Nas análises por “Imunoblotting”

pôde ser visto que as frações da região básica do veneno de *B. jararacussu* foram fracamente reconhecidas tanto pelo soro homologo como pelo soro heterólogo. Esses resultados chamam atenção, visto que mostram a baixa imunogenicidade deste veneno e se destaca a importância destas frações para a problemática na neutralização dos efeitos locais deste veneno pelo soro antibotrópico comercial.

Com o desenvolvimento do mapa de similaridade imunológica do veneno de *B. jararacussu* (Figura 14), foi possível determinar, mais precisamente, as áreas de interesse neste estudo. As regiões de similaridade estrutural baixa foram separadas de acordo com seu perfil imunogênico. Na região de pl ácido, o soro homólogo foi capaz de reconhecer algumas frações, enquanto que o soro heterólogo não, mostrando que estas frações apresentam importantes diferenças estruturais. Estas diferenças foram suficientes para que os anticorpos específicos para o veneno de *B. jararaca* não reconhecessem os epítomos das referidas frações, sob as condições experimentais utilizadas neste estudo. No entanto, estas frações foram reconhecidas pelo soro homólogo, sugerindo que são bons imunógenos e despertando um maior interesse nestas moléculas.

Visto a importância das proteínas da região ácida, o isolamento destas moléculas foi um importante passo neste estudo. Pelo caráter ácido destas proteínas, a técnica proposta foi a isoeletrofocalização. Como os venenos são misturas complexas de proteínas, a purificação destas moléculas geralmente envolve diferentes etapas cromatográficas (De-Simone *et al.*, 2005). No entanto, neste trabalho, a fração ácida do veneno de *B. jararacussu*, de peso molecular em torno de 60 kDa foi purificada, sendo utilizado uma metodologia que permitiu, em apenas uma etapa, o isolamento desta molécula. Este fato é importante uma vez que, quanto menor o número de etapas utilizadas em uma purificação, menor o custo e maior o rendimento do processo.

Tentou-se identificar a fração ácida do veneno de *B. jararacussu* através da hidrólise depois de separação em gel 2D seguido de análise por MS/MS (MALDI Tof-Tof). No entanto, não foi possível a obtenção de identificação pelos métodos clássicos. Como a purificação desta fração por isoeletrofocalização foi bem sucedida, a metodologia utilizada para identificar esta molécula foi a seguinte: uma alíquota da amostra já purificada foi hidrolisada por tripsina em

solução e identificada utilizando-se o Q-Tof como ferramenta. Diferente o MALDI Tof-Tof, o Q-Tof conta com um sistema de cromatografia de fase reversa acoplado ao sistema, além da sua fonte de ionização ser do tipo electrospray e os analisadores do tipo quadrupolo associado a um Tof (time-of-flight). Essas diferenças metodológicas foram importantes, pois foram geradas 96 fragmentações peptídicas e, a partir deste mapa peptídico e utilizando-se a interface do programa MASCOT, foi possível a identificação da molécula. Dois peptídeos apresentaram uma homologia de 100% com uma serino proteinase do banco de genes de *B. insularis* (Junqueira de Azevedo e Ho, 2002). A seqüência do gene pela qual a proteína ácida (Bjssu-pl2,2) foi identificada, codifica para uma protease com domínio tripsina, denominada BOTIN. No entanto, há considerações importantes a serem feitas sobre essa identificação. Pela análise da seqüência primária da BOTIN, esta é uma proteína de 30 kDa e pI 8,8. Já a Bjssu-pl2,2 é uma proteína de aproximadamente 60 kDa e pI 2,2. Estas diferenças encontradas podem ser devido à diferenças na seqüência polipeptídica e/ou por mudanças pós-traducionais. Entretanto, análises suplementares confirmaram a atividade proteolítica desta molécula mostrando que Bjssu-pl2,2 é uma protease e, provavelmente, do tipo trombina.

A partir do alinhamento da BOTIN com proteínas do banco de dados e ainda analisando a presença do peptídeo RSVANDDEVIRY nestas proteínas, pôde ser visto que este peptídeo é bem conservado em outra protease, a Bothrombin (serino proteinase de *B. jararaca*) e ausente na PA-BJ (outra serino proteinase de *B. jararaca*). Por outro lado, o peptídeo RKPALYTKV é conservado na PA-BJ e ausente na Bothrombin. Estes dados são relevantes uma vez que a Bothrombin é uma trombina-simile com atividade fibrinogenolítica (Nishida, 1994) enquanto que a PA-BJ é uma trombina – simile com atividade sobre plaqueta (agregação plaquetária), porém não apresenta atividade fibrinogenolítica (Serrano *et al*, 1995) Uma hipótese é que a Bjssu-pl2,2 possa ter conservado o sítio catalítico de ambas as proteínas e, conseqüentemente, apresentar a atividade biológica tanto de uma, como da outra proteína homóloga. Esta hipótese, no entanto, ainda deve ser testada.

Outro ponto se refere a possibilidade da Bjssu-pl 2,2 conservar a estrutura geral da família da proteína e, por esse motivo, esta molécula apresentar um peso molecular consideravelmente maior que os das proteínas

homólogas. Reforçando essa hipótese, Colombini et al. 2001, chama atenção para o fato de que, comparando o perfil imunológico dos venenos de *B. atrox* e *L.m. muta*, as proteínas do veneno de *Lachesis* conservam uma estrutura geral da família, variando devido a presença de novos domínios ou motivos, fato que gera diferenças na reatividade imunológica e, possivelmente, diferenças na atividade tóxica. Esta hipótese se baseia no fato de que o veneno de *L. m. muta* possui uma fração hemorrágica a mutalisina-I (Sanchez et al., 1987), a qual pode ser correlacionada com metaloproteinase do tipo P4 de acordo com o seu peso molecular. Toxinas hemorrágicas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* são freqüentemente relacionadas com metaloproteinase do tipo P1 ou P3, e diferenciam-se de P4 pela ausência do domínio lectina que pode estar envolvido na atividade hemorrágica (Bjarnason & Fox, 1994). Por outro lado, enzimas tóbina - símile do veneno botrópico não apresentam atividade neurotóxica, enquanto que a gioxina do veneno de *Lachesis* apresenta esta atividade. Além disso, o N-terminal da Calicreína - símile do veneno de *Lachesis* revela muitas substituições de aminoácidos comparado com enzimas tóbina - símile do veneno Botrópico (Giovanni-de Simone et al., 1997). Esses fatos reforçam a idéia de que a *Bjssu-pl2,2* possa apresentar importantes modificações estruturais, que não estão presentes nas moléculas homólogas do veneno de *B. jararaca* tornando-a uma boa candidata para estudos mais precisos sobre seu potencial biomardor para o veneno de *B. jararacussu*.

O soro anti-veneno de *B. jararacussu* somente reconhece a *Bjssu-pl 2,2* quando analisada sob condições não redutoras (Figura 18), o que sugere que os anticorpos específicos para esta proteína dependem de que os epítomos apresentem uma certa conformação para que ocorra reconhecimento. De acordo com a predição de epítomos a partir da seqüência primária, na BOTIN (dados não mostrados) há cinco regiões consideradas como prováveis regiões antigênicas da proteína. No entanto, como foi visto, o soro anti-jararacussu não reconheceu a *Bjssu-pl2,2* quando analisada sob condições redutoras. Este fato sugere que, a *Bjssu-pl2,2* pode apresentar diferenças estruturais consideráveis quando comparada com a BOTIN, as quais foram suficientes para que esta molécula não conservasse em sua seqüência primária, os epítomos lineares preditos para a BOTIN.

Um outro ponto importante que chama atenção neste estudo se refere a observação de uma baixa imunogenicidade do veneno de *B. jararacussu*. Nos experimentos de soroneutralização *in vivo*, pôde ser observado que, somente comparando a neutralização dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, pelos seus respectivos soros homólogos, foi observado que o soro anti-jararaca foi duas vezes mais eficiente na proteção contra a letalidade, tanto para o veneno homólogo como para o heterólogo. Estes resultados vêm de acordo com o descrito na literatura, sobre a questão da baixa imunogenicidade do veneno de *B. jararacussu* (Dias da Silva 1989, Moura da Silva, 1990). Nas análises por “imunoblotting” a partir do fracionamento por géis 2D-PAGE, pôde ser observado que na região básica há duas proteínas majoritárias, que foram mal neutralizadas tanto pelo soro homólogo, como pelo heterólogo, confirmando a questão da baixa imunogenicidade deste veneno visto na literatura como também, relacionando a estas proteínas a problemática da má neutralização deste veneno pelo soro antibotrópico comercial.

A proteína de pl básico e peso molecular em torno de 29 kDa foi identificada como uma serino proteinase da família S1. A seqüência nucleotídica desta proteína já esta depositada em banco de dados (Kashima et al., 2004), sendo reportada a esta molécula, apenas atividade peptidásica. A partir da seqüência primária, esta proteína tem peso molecular de 28 kDa e pl 8,8. No entanto, neste estudo pôde ser visto, que apesar do peso molecular se confirmar, o pl determinado foi acima do predito, já que esta molécula focalizou no pH extremo da fita (pH10), podendo então, determinar que o pl desta molécula é ≥ 10 . A partir da análise de similaridade (BLAST) da seqüência desta proteína no banco de dados. Foi verificado que esta molécula se assemelha a serino proteinases com atividade em fibrinogênio e cininogênio. No entanto, moléculas deste tipo como a halystase da serpente *Agkistrodon halys*, clivam fibrinogênio sem induzir a formação do coágulo (Matsui et al., 1998) sugerindo estarem mais relacionadas na clivagem de cininogênio e formação de Bradicinina no contexto do envenenamento. Como pode ser visto, mais estudos a respeito desta molécula devem ser realizados, principalmente sobre dois aspectos: o primeiro, buscando-se o entendimento da função desta molécula no envenenamento causado pela *B. jararacussu*, visto que é uma das proteínas que não foram reconhecidas nem pelo soro homólogo nem pelo

heterólogo e, em segundo, um estudo imunológico mais preciso deve ser realizado, devido ao potencial biomarcador desta molécula para o veneno de *B. jararacussu*.

Para o veneno de *B. jararacussu* já havia sido descrito a presença de proteínas do tipo trombina-simile (fibrinogenases) (Kashima 2004; De-Simone 2005). No entanto, nenhum dado a respeito do perfil imunológico destas enzimas foi mencionado. Vale ressaltar, que De-Simone (2005) identifica uma trombina-simile do veneno de *B. jararacussu* com atividade fibrinogenolítica de peso molecular 48 kDa. Neste estudo, porém, as serino proteinases identificadas apresentavam 29 kDa e 56 kDa, ambas relacionadas por homologia com enzimas trombina-simile. Assim, a *Bjssu-pl2,2* (56 kDa) foi, reportada neste trabalho pela primeira vez para esta espécie.

Um outro ponto importante a ser salientado neste trabalho, diz respeito a Bothropstoxina-I (*BthTX-I*), uma toxina pertencente a família das fosfolipases do tipo A₂. Para esta família de proteína encontrada em venenos ofídicos já foi descrita uma variedade de atividades farmacológicas do tipo: neurotóxica, miotóxica, edematogênica, hipotensiva, cardiotoxica e anticoagulante (Gutiérrez et al, 1995). A *BthTX-I* é considerada a principal miotoxina do veneno de *B. jararacussu* sendo que esta molécula apresenta, além da miotoxicidade, a indução de bloqueio neuromuscular (atividade neurotóxica) (Oshima-Franco 2001; Zamunér 2004).

Neste trabalho pôde ser observado que a *BthTX-I* não foi reconhecida pelos soros anti-veneno homólogo e heterólogo. Sobre este fato surgem duas questões importantes que merecem destaque. A primeira aponta para a questão de esta molécula apresentar baixa imunogenicidade, podendo ser a principal responsável pelos efeitos danosos no local da picada, mal neutralizados pelo soro antibotrópico comercial. Reforçando esta idéia, Zamunér 2004 mostra em seus resultados que o soro antibotrópico neutraliza apenas 30,4% da atividade miotóxica do veneno de *B. jararacussu*. Além disso, Beghini 2005 mostra que um soro específico para a *crototoxina*, uma fosfolipase A₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi eficiente na proteção da atividade miotóxica e neurotóxica da *BthTX-I*. Estes fatos sugerem que a administração do soro antibotrópico crotálico no acidente causado por

B.jararacussu pode ser mais eficiente, principalmente pela contribuição da fração crotálica na neutralização da *BthTX-I*.

A segunda questão, diz respeito ao potencial biomarcador da *BthTX-I*, visto que mostrou uma baixa similaridade estrutural com proteínas do veneno de *B.jararaca*. Outros autores já haviam chamado atenção para a ausência de miotoxina de pl básico no veneno de *B. jararaca* (Moura-da-Silva *et al*, 1990b, Andrião-Escarso *et al* 2000) contribuindo para a idéia desta molécula conter epítomos espécie específicos, podendo estes, portanto, serem utilizados como ferramenta para o desenvolvimento de um diagnóstico diferencial para a *B. jararacussu*.

Com a pré-purificação do veneno de *B. jararacussu* por cromatografia de exclusão molecular, seguido de fracionamento por 2D-PAGE e análise por “imunoblotting” foi possível identificar novos alvos de interesse para o estudo imunológico deste veneno. Como pôde ser visto nos resultados apresentados na Figura 21, a região ácida de alto peso do veneno de *B. jararacussu* mostrou uma importante diferença no reconhecimento destas frações frente aos soros homólogo e heterólogo. Este fato demonstra que no subproteoma do veneno de *B. jararacussu* possa conter moléculas de importância para o entendimento do perfil imunológico deste veneno. Os estudos do perfil imunológico do subproteoma do veneno de *B. jararacussu* continuam em andamento, visto a importância destas moléculas para a compreensão da complexidade da ação biológica deste veneno no acidente ofídico.

Assim, a abordagem deste trabalho, utilizando eletroforese bidimensional somado a técnicas sensíveis como “imunoblotting” e espectrometria de massas, se mostrou muito interessante para o estudo imunológico das frações do veneno de *B. jararacussu*. As diferenças no reconhecimento dos soros homólogos e heterólogos frente ao veneno de *B. jararacussu* permitiram a identificação de três proteínas com potencial para serem utilizadas como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico diferencial para esta espécie. Além disso, os resultados deste trabalho reforçam a questão da utilização do soro antitoxinotrópico crotálico no acidente causado por esta espécie, relacionando a importância da fração crotálica para a neutralização de toxinas pouco imunogênicas do veneno de *B. jararacussu*, como é o caso da *BthTX-I*.

7 – CONCLUSÕES

- I. Com as análises de “Imunoblotting” a partir do fracionamento do veneno por SDS-PAGE foi possível verificar a reatividade cruzada conferida pelos soros homólogos e heterólogos frente ao veneno de *B. jararacussu*. No entanto, esta técnica não mostrou ser uma boa ferramenta para a identificação de moléculas com potencial biomarcador neste estudo.
- II. A abordagem utilizada neste trabalho, que consistiu do fracionamento do veneno por eletroforese bidimensional, seguido de análise por “Imunoblotting” e identificação por Espectrometria de Massas, mostrou ser uma boa ferramenta na triagem e identificação de moléculas biomarcadoras em misturas protéicas complexas, como é o caso de venenos animais.
- III. Neste trabalho foi possível identificar pelo menos três moléculas com potencial biomarcador do veneno de *B. jararacussu*, a Bjsu-pl2,2, a Bothropstoxina-I e a serino proteinase de 29 kDa. Dentre estas, as duas últimas também se destacaram pela baixa imunogenicidade.
- IV. Devido a baixa imunogenicidade da Bothropstoxina-I evidenciada neste estudo e a alta reatividade cruzada desta molécula com a crotoxina (PLA₂) do veneno de *C. d. terrificus*, visto na literatura, reforça-se a idéia da utilização do soro anibotrópico crotálico no tratamento do acidente causado por *B. jararacussu*, visto a importância da fração crotálica para a neutralização de um dos mais importantes componentes deste veneno.

8 – BIBLIOGRAFIA

- Abbas, KA; Lichtman HA; Pober SJ. **Anticorpos e Antígenos. In Imunologia Celular e Molecular - 4^a Ed**, Revinter; Brasil, 2002, p 56-57.
- Aguiar AS, Alves CR, Melgarejo A, Giovanni-de-Simone S. **Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom**. *Toxicon*. 1996 May; 34(5):555-65.
- Altschul, SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402(1997).
- Amaral, A. **Contribuição à Biologia dos Ophideos Brasileiros (habitat, hábitos e alimentação)**; 1^a Nota Prévia. (Em coletânea dos trabalhos do Instituto Butantan de 1918 a 1924), São Paulo, 1927; p.175-181.
- Amuy E, Alape-Giron A, Lomonte B, Thelestam M, Gutierrez JM. **Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomations by coral snakes (*Micrurus species*)**. *Toxicon*. 1997 Nov;35(11):1605-16.
- Ananthapadmanabhan, J., 1991. **Snake bite**. In: Dalal, P.M. (ED), *Medicine Update*. Association of Physicians of India, Bombay, pp. 93-114.
- Anderton BH, Thorpe RC. **New methods of analyzing for antigens and glycoproteins in complex mixtures**. *Immunol. Today* 1980, v1, pp122-127.
- Andriao-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Diaz C, Lomonte B, Gutierrez JM, Giglio JR. **Myotoxic phospholipases A(2) in Bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu***. *Biochimie*. 2000 Aug;82(8):755-63.
- Bjarnason JB, Fox JW. **Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms**. *Pharmacol Ther*. 1994;62(3):325-72.
- Barral-Netto M, Schriefer A, Vinhas V, Almeida AR. **Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom**. *Toxicon*. 1990;28(9):1053-61.
- Barral-Netto M, von Sohsten RL. **Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice: evidence for a rapid clearance**. *Toxicon*. 1991;29(4-5):527-31.

- Beghini DG, da Cruz-Hofling MA, Randazzo-Moura P, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Hyslop S, Marangoni S. **Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom.** *Toxicon* 2005 Nov;46(6):604-11.
- Belluomini HE. **Produção de veneno de serpentes em cativeiro.** *Arq Inst Biol.* 1964, 31, 149-154.
- Berg JM; Tymoczko JL; Strayer L. **Biochemistry.** New York: W. H. Freeman and Co.; 2002. quinta edição.
- [Bolanos R](#), [Rojas O](#), [Ulloa Flores CE](#). **Biomedical aspects of 4 cases of snake bites by *Lachesis muta* (Ophidia: Viperidae) in Costa Rica.** *Rev Biol Trop.* 1982 Jul;30(1):53-8. Spanish.
- Brazil V. **Serum anti-ophidico.** *Brasil-Médico*, XVII, 1903; 39: p.384-385.
- Brazil V. **A defesa contra o ofidismo.** São Paulo, Pocai & Weiss, 1911; p152.
- Calmette A. **Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation.** *Ann. Int. Pasteur*, 1894; p. 257-91.
- Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMS, Haddad Jr. org. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1 ed. Sarvier, São Paulo; 2003.
- Chavez-Olortegui C, Lopes CS, Cordeiro FD, Granier C, Diniz CR. **An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms.** *Toxicon.* 1993 Apr;31(4):417-25
- Chavez-Olortegui C, Penaforte CL, Silva RR, Ferreira AP, Rezende NA, Amaral CF, Diniz CR. **An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian *Bothrops* species and *Crotalus durissus*.** *Toxicon.* 1997 Feb; 35(2):253-60.
- [Chippaux JP](#), [Goyffon M](#). **Venoms, antivenoms and immunotherapy.** *Toxicon.* 1998 Jun; 36(6):823-46.
- Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. **Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function.** *J Protein Chem.* 1993 Feb;12(1):57-64.

- Colombini M, Fernandes I, Cardoso DF, Moura-da-Silva AM. ***Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy.** *Toxicon*. 2001 May;39(5):711-9.
- Colombini M. **Reatividade antigênica cruzada entre os venenos de *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta* e o desenvolvimento de um teste imunoenzimático diferencial para acidentes causados por essas serpentes.** 2003. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.
- Correa-Netto C, Melgarejo AR, Aguiar AS, Nascimento ER, Souza CMV, Santos R. **Estudo Comparativo da Dose Letal 50% (DL₅₀) do veneno de *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1884, em camundongos e rãs.** *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia*; 2002. Itajaí, Santa Catarina, Brasil.
- Coulter AR, Sutherland SK, Broad AJ. **Assay of snake venoms in tissue fluids.** *J Immunol Methods*. 1974 Mar;4(2):297-300.
- Coulter AR, Harris RD, Sutherland SK. **Clinical laboratory: enzyme immunoassay for the rapid clinical identification of snake venom.** *Med J Aust*. 1980 May 3; 1(9): 433-5.
- Dias da silva W, Guidolin R, Raw I, et al. **Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of *Bothrops* species.** *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 153-68.
- Dos Santos MC, Gonçalves LRC, Fortes-Dias CL, et al. **A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*.** *Ver Inst Méd Trop São Paulo* 1992; 34: 77-83.
- De Roodt AR, Dolab JA, Fernandez T, Segre L, Hajos SE. **Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina.** *Toxicon*. 1998 Jul; 36(7):1025-38.
- De-Simone SG, Correa-Netto C, Antunes OA, De-Alencastro RB, Silva FP Jr. **Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two p-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Aug 5;822(1-2):1-9.
- França FOS & Málaque CMS. **Acidente Botrópico.** In: **Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMS, Haddad Jr. org. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1 ed. Sarvier, São Paulo; 2003. v. .1 p. 72-86.
- Giovanni-De-Simone S, Aguiar AS, Gimenez AR, Novellino K, de Moura RS. **Purification, properties, and N-terminal amino acid sequence of a kallikrein-like enzyme from the venom of *Lachesis muta rhombeata* (Bushmaster).** *J Protein Chem*. 1997 Nov;16(8):809-18.

- Gutierrez JM, Avila C, Camacho Z, Lomonte B. **Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica.** *Toxicon*. 1990;28(4):419-26.
- Gutierrez JM, Lomonte B. **Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms.** *Toxicon*. 1995 Nov;33(11):1405-24.
- Hawgood BJ. **Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr vital Brazil (1865-1950).** *Toxicon*, 1992; v.30: p. 573-579
- Heneine LG, Araujo dos Santos MR, Dutra de Carvalho A Jr, da Silva Gontijo S. **A capture enzyme-linked immunosorbent assay for species-specific detection of Bothrops venoms.** *J Immunoassay*. 1999 Feb-May;20(1-2):91-101.
- Iwanaga S & Suzuki T. **Enzymes in snake venom.** In: **Snake Venom**, ed lee, C Y. Berlin: Springer-verlag; 1979 p. 61-158.
- Jing X. **Establishment of a two-dimensional electrophoresis map of human mitochondrial proteins.** 2003. Doctor Thesis; Humboldt-Universität Berlin, Berlin.
- Junqueira-de-Azevedo Ide L, Ho PL. **A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs).** *Gene*. 2002 Oct 16;299(1-2):279-91.
- Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Giuliati S, Faria M Jr, Xavier MA, Fontes MR, Giglio JR, Franca SC. **Analysis of Bothrops jararacussu venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2.** *Biochimie*. 2004 Mar;86(3):211-9.
- Labrousse H, Nishikawa AK, Bon C, Avrameas S. **Development of a rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snake bite.** *Toxicon*. 1988;26 (12):1157-67.
- Laemmli EK, **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, v.227, p 680-685.
- [Laloo DG](#), [Theakston RD](#). **Snake antivenoms.** *J Toxicol Clin Toxicol*. 2003; 41(3):277-90; 317-27. Review.
- Lopez-Lozano JL, de Sousa MV, Ricart CA, Chavez-Olortegui C, Flores Sanchez E, Muniz EG, Buhrnheim PF, Morhy L. **Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest.** *Toxicon*. 2002 Jul;40(7):997-1006.

- Markland FS. **Snake venoms and the hemostatic system.** *Toxicon*. 1998 Dec;36(12):1749-800. Review.
- Marques OAV, Esterovic A, Sazima I. **Serpentes da Mata Atlântica. Guia ilustrado para a Serra do Mar.** Ribeirão Preto; Holos; 2001.
- Matsui T, Sakurai Y, Fujimura Y, Hayashi I, Oh-Ishi S, Suzuki M, Hamako J, Yamamoto Y, Yamazaki J, Kinoshita M, Titani K. **Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen.** *Eur J Biochem*. 1998 Mar 15;252(3):569-75.
- MELGAREJO AR. **Serpentes peçonhentas do Brasil.** In: Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMS, Haddad Jr. org. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1 ed. Sarvier, São Paulo; 2003. v. .1 p. 33-61.
- Méier J. **Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance *Bothrops atrox*.** *Toxicon*. 1986;24(1):41-6.
- Milani JR, Jorge MT, de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, et al .**Snake bites by the jararacucu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State, Brazil.** *QJM*. 1997 May; 90(5): 323-34.
- Ministério da Saúde do Brasil, 1991. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Fundação Nacional da Saúde, Brasília.
- Ministério da Saúde do Brasil, 1996. **Normas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-rábico,** Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância Sanitária No 174 de 11 de Novembro de 1996.
- Ministério da Saúde do Brasil, 2001. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
- Morel CM, **Conferência Magna - Pesquisa em Saúde no Mundo. Anais da 2ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde,** Brasília, 25 a 28 de julho de 2004: Ministério da Saúde; Conselho Nacional de Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- Moura da Silva AM, DÍmpèrio Lima MR, Nishikawa AK, Brodskyn CI, Dos Santos MC, Furtado MFD et al. **Antigenic Cross-Reactivity of Venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*.** *Toxicon*, 1990a; v28(2), p. 181-88.

- Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. **Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different Bothrops species.** *Toxicon.* 1990b;28(11):1293-301.
- Moura-da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RD. **Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes.** *Toxicon.* 1991;29(6):713-23.
- Moura da Silva, A. M. **Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida.** *Biol. Biotechnol.* 1992; V. 3, p.3-7.
- Moussatché H & Perales J. **Factors underlying the natural resistance of animals against snake venoms.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1989; 84: 391-94.
- [Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, Titani K, Yoshida E, Sugimoto M, Yoshioka A, et al.](#) **Purification and characterization of bothrobin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of Bothrops jararaca.** *Biochemistry.* 1994 Feb 22;33(7):1843-9.
- O' Farrel PH. **High resolution two-dimensional eletrophoresis of proteins.** *J. Biol. Chem.* 1975; 250 (10), 4007-4021.
- O'Leary MA, Isbister GK, Schneider JJ, Brown SG, Currie BJ. **Enzyme immunoassays in brown snake (Pseudonaja spp.) envenoming: detecting venom, antivenom and venom-antivenom complexes.** *Toxicon.* 2006 Jul;48(1):4-11. Epub 2006 Apr 17.
- Oshima-Franco Y, Leite GB, Silva GH, Cardoso DF, Hyslop S, Giglio JR, da Cruz-Hofling MA, Rodrigues-Simioni L. **Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu (jararacucu) venom by crotoxin antiserum and heparin.** *Toxicon.* 2001 Oct;39(10):1477-85.
- Parida, L., A. Floratos and I. Rigoutsos, **MUSCA: An Algorithm for Constrained Alignment of Multiple Data Sequences.** *Proceedings 9th Workshop on Genome Informatics*, Tokyo, Japan. December 1998.
- Phisalix M & Bertrand G. **Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère.** *C. R. Soc. Biol,* 1894; p. 111-15.
- Rosenfeld G. **Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América.** In: Bucherl W, Buckley EE, Deulofeu V, editors. *Venomous animals and their venoms.* New Yourk: Academic Press, 1971: 354-841.
- Sanchez EF, Magalhaes A, Diniz CR. **Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the bushmaster snake, Lachesis muta muta.** *Toxicon.* 1987;25(6):611-9

- SBH - **Sociedade Brasileira de Herpetologia** [on line]. Brasil; 2007. [capturado em 25 de janeiro de 2007] Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>
- Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P. **Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997)**. *Toxicon*. 1999 Apr;37(4):565-86.
- Selvanayagam ZE, Gnanavendhan SG, Ganesh KA, Rajagopal D, Rao PV. **ELISA for the detection of venoms from four medically important snakes of India**. *Toxicon*. 1999 May;37(5):757-70.
- Selvanayagam ZE, Neuzil P, Gopalakrishnakone P, Sridhar U, Singh M, Ho LC. **An ISFET-based immunosensor for the detection of beta-Bungarotoxin**. *Biosens Bioelectron*. 2002 Sep;17(9):821-6.
- [Serrano SM](#), [Mentele R](#), [Sampaio CA](#), [Fink E](#). **Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet aggregating activity from the venom of Bothrops jararaca**. *Biochemistry*. 1995 May 30;34(21):7186-93.
- Theakston RD, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. **Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody**. *Lancet*. 1977 Sep 24;2 (8039):639-41.
- Theakston RD, Pugh RN, Reid HA. **Enzyme-linked immunosorbent assay of venom-antibodies in human victims of snake bite**. *J Trop Med Hyg*. 1981 Jun; 84(3):109-12.
- Theakston RD. **The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research**. *Toxicon* 1982 21(3): 341-52.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, **Eletroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 1979, v. 76, p. 4350-4354.
- Tyers M, Mann M. **From genomics to proteomics**. *Nature*. 2003 Mar 13; 422 (6928): 193-7
- Warrell DA. **Snake venoms in science and clinical medicine. 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites**. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989 Nov-Dec; 83(6):732-40.
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, *et al*. **From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis**. *Biotechnology (N Y)*. 1996 Jan;14(1):61-5.

- World Health Organisation. **Progress and Characterization of Venom and Standardization of Antivenoms.** 1981; WHO Offset Publication n° 58: 1-4
- Zamunér SR, da Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. **Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom.** Toxicon. 2004 Sep 1;44(3):259-71.