UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LUCAS BENÍCIO CAMPOS

Atividade tóxica da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* e produção de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) contra a peçonha bruta

Ribeirão Preto

2011

LUCAS BENÍCIO CAMPOS

Atividade tóxica da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* e produção de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) contra a peçonha bruta

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Campos, Lucas Benício

Atividade tóxica da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* e produção de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) contra a peçonha bruta - Ribeirão Preto, 2011.

108 p. : Il. : 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Netto, Joaquim Coutinho

1. *Lachesis muta rhombeata*; 2. Phage Display

Nome: Campos, Lucas Benício

Título: Atividade tóxica da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* e produção de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) contra a peçonha bruta

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
-------------	-------	-------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
-------------	-------	-------------	-------

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
-----------	-------	--------------	-------

Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
-------------	-------	-------------	-------

Dedico esta dissertação a meus pais, Luiz Tadeu e Maria Tereza, pelo amor e incentivo, à minha irmã Laura, pela amizade, e à Fernanda pelo carinho e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José Elpidio Barbosa.

Ao professor Joaquim Coutinho Netto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial à Ivone e ao Ronaldo.

À equipe do serpentário da FMRP, principalmente ao Luis.

Aos amigos de laboratório Manuela, Eduardo, Thaís, Carol e Jaqueline.

Às funcionárias Vânia e Vera.

À Fernanda.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Aos amigos de república, André, Fernando, Fausto e Antônio.

Às agências de fomento Capes e CNPq.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**"Aventure-se, pois da mais insignificante pista surgiu toda
riqueza que o homem já conheceu"**

John Masefield

RESUMO

Campos, L.B. **Atividade tóxica da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* e produção de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) contra a peçonha bruta.** 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O tratamento atual indicado para casos de envenenamentos por peçonhas é a administração intravenosa de antivenenos, produzidos através da hiperimunização de animais. Entretanto, os antivenenos disponíveis podem, algumas vezes, não proteger os pacientes e causar reações de hipersensibilidade. Fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido oxidases (LAO), metalo e serinoproteases são os principais componentes de peçonhas ofídicas e contribuem para a neurotoxicidade, hemorragia, hemólise, miotoxicidade, cardiotoxicidade e formação de edemas. Foram empregados ensaios para avaliar as atividades das enzimas presentes na peçonha de serpentes da espécie *Lachesis muta rhombeata* e aquele para atividade de protease foi otimizado. A tecnologia de *Phage display* foi empregada para a seleção de fagos-anticorpos capazes de reconhecer a peçonha bruta. Os fagos foram amplificados em *Escherichia coli* TG1 e usados para infectar *E. coli* HB2151, a qual produz fragmentos de anticorpos humanos solúveis. Estes foram purificados e utilizados em testes de inibição de alguns dos componentes tóxicos da peçonha. Os testes de atividade para PLA₂, protease e L-aminoácido oxidase foram padronizados com sucesso e as 3 proteínas mostraram elevada atividade enzimática. Após otimização, a quantidade de peçonha necessária para o ensaio de protease foi reduzida em 25 vezes. A massa molecular de PLA₂ foi estimada em 17 kDa e as massas moleculares de proteases foram estimadas em 40, 35 e 24 kDa, através de zimogramas. O método de *bio panning* foi eficiente para a seleção de fagos-anticorpos contra a peçonha bruta. Diversos fragmentos de anticorpos foram purificados e incubados com a peçonha bruta para testar suas capacidades de neutralização sobre cada enzima. Cinco clones demonstraram-se hábeis em inibir a PLA₂ através da inibição da hemólise. O clone 4E inibiu 100% da hemólise durante as duas horas de ensaio quando pré-incubado na proporção 2:1 (scFv:peçonha). Os clones 2C e 4E inibiram 100% durante uma hora quando pré-incubados na proporção 1:1 e os clones 2F e 9F inibiram a hemólise parcialmente. Outros testes serão conduzidos para a seleção de clones capazes de neutralizar as demais enzimas, os quais, juntamente com os clones já selecionados, serão analisados através de ensaios *in vivo*. Espera-se que eles possam contribuir para a construção de um novo antiveneno capaz de superar algumas das dificuldades associadas às técnicas de imunoterapia convencionais.

Palavras chave: *Lachesis muta rhombeata*, fosfolipase A2, protease, L-aminoácido oxidase, scFv, *Phage Display*.

ABSTRACT

Campos, L.B. **Toxic activity of *Lachesis muta rhombeata* venom and production of human antibody fragments (scFv) against the crude venom.** 2011. 108 pages. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The current treatment for animal envenoming is the intravenous administration of antivenoms, produced by animal hyperimmunization. Unfortunately, available antivenoms sometimes do not protect patients and may cause hypersensitivity reactions. Phospholipases A₂ (PLA₂), L-amino acid oxidases, metallo and serine proteases are considered the most important snake venom components and contribute to neurotoxicity, hemorrhage, hemolysis, myotoxicity, edematogeny and cardiotoxicity. Assays for evaluating the enzymes present in *Lachesis muta rhombeata* venom were developed and the protease one was optimized. Phage display technology was used to select phage antibodies able to recognize the crude venom. Phages were amplified in *Escherichia coli* TG1 and used to infect *E. coli* HB2151, which produces human antibody fragments. Inhibition tests aiming the neutralization of some toxic components of the venom were performed using purified antibody fragments. Activity assays for evaluating PLA₂, protease and L-amino acid oxidase were successfully performed and all enzymes showed high activity levels. The molecular mass of PLA₂ was estimated in 17 kDa and the molecular mass of proteases were estimated in 40, 35 and 24 kDa, by zymography. After optimizing the conditions for proteolytic assay, it was possible to use 25 times less venom than it was necessary at first. The bio panning method was efficient for selecting specific phage antibodies against the crude venom. Several clones were selected to infect HB2151 and to produce soluble antibody fragments, which were purified and incubated with the venom to test their inhibition capacity over each enzyme. Five clones demonstrated ability to neutralize PLA₂ by inhibiting hemolysis. The clone 4E could inhibit 100% of hemolysis for over 2 hours when preincubated at the ratio 2:1 (scFv:venom). Clones 2C and 4E could inhibit 100% for 1 hour when preincubated at the ratio 1:1 and clones 2F e 9F could inhibit partially. Other tests will be performed to select clones able to neutralize other enzymes and, together with the clones already selected, will be evaluated by in vivo experiments. It is expected that they may contribute to the construction of a potential new antivenom able to overcome some of the problems associated with conventional immunotherapy.

Keywords: *Lachesis muta rhombeata*, phospholipase A₂, protease, L-amino acid oxidase, scFv, Phage Display.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécies de serpentes pertencentes ao gênero <i>Lachesis</i>	19
Figura 2. Distribuição geográfica das subespécies de <i>Lachesis muta</i> no Brasil.	19
Figura 3. Representação de imunoglobulina intacta e fragmentos de anticorpos.....	25
Figura 4. Representação de um fago filamentoso.....	27
Figura 5. Análise da peçonha por SDS-PAGE.	54
Figura 6. Ensaio cinético de hemólise indireta.	55
Figura 7. Ensaio de hemólise indireta de ponto final.	56
Figura 8. Zimograma para atividade de fosfolipase A2.	57
Figura 9. Ensaio de atividade proteolítica variando-se a concentração de peçonha.	58
Figura 10. Ensaio de atividade proteolítica com substrato não desnaturado e desnaturado.	59
Figura 11. Ensaio de atividade proteolítica variando-se a temperatura.	60
Figura 12. Ensaio de atividade proteolítica variando-se o substrato.....	61
Figura 13. Ensaio de atividade proteolítica variando-se a concentração de peçonha.....	62
Figura 14. Ensaio de inibição da proteólise com PMSF e EDTA.....	63
Figura 15. Zimograma para atividade de protease.	64
Figura 16. Zimograma para atividade de protease na presença de PMSF e EDTA.	65
Figura 17. Ensaio de L-aminoácido oxidase variando-se a concentração de peçonha.....	66
Figura 18. Título de fagos eluídos.	67
Figura 19. ELISA de fagos-anticorpos policlonais.	68
Figura 20. ELISA de fagos-anticorpos policlonais.	69
Figura 21. Elisa de fagos-anticorpos monoclonais.	70
Figura 22. Elisa de fagos-anticorpos monoclonais precipitados.	71
Figura 23. Perfil eletroforético do clone 9F.....	72
Figura 24. Perfil eletroforético dos clones purificados..	73
Figura 25. Ensaio de inibição da atividade hemolítica.	74
Figura 26. Ensaio de inibição de protease com scFv.	75
Figura 27. Ensaio de inibição de protease utilizando sobrenadante de cultura.	77
Figura 28. Ensaio de inibição de protease utilizando fagos-anticorpos monoclonais precipitados.	78
Figura 29. Ensaio de inibição de L-aminoácido oxidase utilizando scFv.	79
Figura 30. Ensaio de inibição de L-aminoácido oxidase utilizando sobrenadante de cultura.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acidentes causados por serpentes no mundo.....20

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
LB	Luria Bertani
MPBS	Solução fosfato salina contendo leite em pó
NiNTA	Resina de níquel
OPD	Orto-fenilenodiamino
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBST	Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20
PEG/NaCl	Solução de polietilenoglicol e cloreto de sódio
PLA₂	Fosfolipase A2
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
Salina	Solução de NaCl 0,9% (p/v)
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
u.f.c.	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. Lachesis	18
1.2. Soroterapia	23
1.3. Phage Display.....	26
2. Justificativa	32
3. Objetivos.....	34
4. Materiais e Métodos	36
4.1. Animais e peçonha	36
4.2. Quantificação de proteínas	36
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida	36
4.4. Conjugação de IgG à peroxidase	37
4.5. Ensaio de atividade fosfolipásica	38
4.5.1. Ensaio cinético de hemólise indireta	38
4.5.2. Ensaio de hemólise indireta de ponto final	39
4.5.3. Zimograma para atividade de PLA₂	39
4.6. Ensaio de atividade proteolítica	40
4.6.1. Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha	40
4.6.2. Ensaio de proteólise variando-se o modo de preparo do substrato	40
4.6.3. Ensaio de proteólise variando-se a temperatura	41
4.6.4. Ensaio de proteólise variando-se o substrato	41
4.6.5. Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha	41
4.6.6. Ensaio de inibição da proteólise com PMSF e EDTA.....	42
4.6.7. Zimograma para atividade de protease.....	42
4.7. Ensaio de atividade de L-aminoácido oxidase.....	43
4.8. Produção de fagos-anticorpos	43
4.8.1. Seleção de fagos-anticorpos.....	43
4.8.2. Amplificação de fagos-anticorpos.....	44
4.8.3. Recuperação dos fagos-anticorpos	45
4.8.4. ELISA de fagos-anticorpos policlonais.....	46
4.8.5. Produção de fagos-anticorpos monoclonais	47
4.8.6. ELISA de fagos-anticorpos monoclonais	47

4.9.	Produção de fragmentos de anticorpos humanos solúveis	48
4.9.1.	Infecção de <i>E. coli</i> HB2151.....	48
4.9.2.	Purificação dos fragmentos de anticorpos	49
4.10.	Ensaio de inibição das atividades tóxicas da peçonha	50
4.10.1.	Inibição da atividade hemolítica	50
4.10.2.	Inibição da atividade proteolítica	50
4.10.3.	Inibição da atividade de L-aminoácido oxidase.....	51
5.	Resultados.....	54
5.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	54
5.2.	Ensaio de atividade fosfolipásica	55
5.2.1.	Ensaio cinético de hemólise indireta	55
5.2.2.	Ensaio de hemólise indireta de ponto final	56
5.2.3.	Zimograma para atividade de PLA ₂	57
5.3.	Ensaio de atividade proteolítica	58
5.3.1.	Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha	58
5.3.2.	Ensaio de proteólise variando-se o modo de preparo do substrato	59
5.3.3.	Ensaio de proteólise variando-se a temperatura	60
5.3.4.	Ensaio de proteólise variando-se o substrato	61
5.3.5.	Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha	62
5.3.6.	Ensaio de inibição da proteólise com PMSF e EDTA.....	63
5.3.7.	Zimograma para atividade de protease.....	64
5.4.	Ensaio de L-aminoácido oxidase	66
5.5.	Produção de fagos-anticorpos	67
5.5.1.	Título de fagos-anticorpos eluídos.....	67
5.5.2.	ELISA de fagos-anticorpos policlonais.....	68
5.5.4.	Purificação dos fragmentos de anticorpos	71
5.6.	Ensaio de inibição das atividades tóxicas da peçonha	73
5.6.1.	Inibição da atividade hemolítica	73
5.6.2.	Inibição da atividade proteolítica	75
5.6.3.	Inibição da atividade de L-aminoácido oxidase.....	78
6.	Discussão.....	82
7.	Conclusões	93
8.	Perspectivas	95
9.	Referências	97

10.	Apêndice	104
11.	Anexos.....	108

1. Introdução

1.1. Lachesis

Estudos filogenéticos demonstraram que o gênero *Lachesis*, encontrado em florestas tropicais da América do Sul e América Central, engloba três espécies diferentes. São elas: *L. stenophrys*, *L. melanocephala* e *L. muta*. Esta ainda é dividida em duas subespécies: *L. muta muta* e *L. muta rhombeata* (Figura 1). No Brasil, essas serpentes estão distribuídas em focos de Mata Atlântica (*L. muta rhombeata*) e na floresta amazônica (*L. muta muta*) (Figura 2) (Colombini et al., 2001; Zamudio, 1997). A espécie *L. muta muta* é popularmente conhecida no Brasil como Surucucu, nome originado do Tupi-Guarani que significa serpente que dá muitos botes, muitas picadas. Também é conhecida como Surucucu Pico-de-Jaca e Surucutinga (Damico et al., 2005b). Nos Estados Unidos, é chamada de Bushmaster (Junqueira-de-Azevedo et al., 2006).

O gênero *Lachesis* pertence à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae* e representa as maiores serpentes dessa subfamília no mundo (Lima et al., 2011), atingindo uma média de 2,0 a 2,5 metros na fase adulta. Entretanto, não é incomum encontrar serpentes com até 3,0 metros de comprimento (Sanz et al., 2008). Essa família ainda engloba dois outros gêneros de considerável importância, *Crotalus* e *Bothrops* (Damico et al., 2005a).

No mundo, a causa mais comum de envenenamentos por animais envolve acidentes com artrópodes, entretanto, a maior parte das mortes (cerca de 80%) é causada por serpentes (Stock et al., 2007). O número estimado de acidentes ofídicos é de aproximadamente 5,4 milhões, dos quais mais de 120 mil resultam em morte, conforme pode ser observado na tabela 1 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010; Stock et al., 2007). Mesmo quando não geram fatalidades, casos de envenenamentos podem deixar sequelas e deficiências crônicas, resultado de distúrbios neurológicos e limitações físicas causadas por amputações. Além disso, esses dados são subestimados, visto que muitas vítimas procuram tratamentos tradicionais em vez de hospitais e, algumas vezes, morrem sem dar entrada em hospitais ou postos de atendimentos (Calvete et al., 2009).

Figura 1. Espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Lachesis*. A – *L. muta muta*; B – *L. muta rhombeata* (SESA, 1997); C – *Lachesis melanocephala* e D – *Lachesis stenophrys* (JCVI, 2009).

Figura 2. Distribuição geográfica das subespécies de *Lachesis muta* no Brasil (Zamudio, 1997).

No Brasil, os números de casos de acidentes envolvendo animais peçonhentos foram 96583 e 86194 para os anos de 2008 e 2009 (dados atualizados em 08/12/2009), respectivamente. Os números de óbitos para os mesmos anos foram 229 e 230 (SINAN/SVS/MS, 2009a, b, c). Em se tratando de acidentes ofídicos, os números foram 26156 e 27655 para os anos de 2008 e 2009, respectivamente, e os números de óbitos para os mesmos anos foram 119 e 125 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). Dentre os acidentes com animais peçonhentos, aqueles envolvendo serpentes são os que apresentam maior frequência e maior gravidade. Os acidentes botrópicos são os mais comuns (aproximadamente 75% dos casos), seguidos dos acidentes crotálicos (7%), laquélicos (1,5%) e elapídicos (0,5%). Serpentes não peçonhentas são responsáveis por cerca de 3% dos acidentes e, em aproximadamente 13% dos casos, os gêneros das serpentes não são especificados. As taxas de letalidade observadas são mais elevadas para os acidentes envolvendo o gênero *Crotalus* (1,85%), seguido dos gêneros *Lachesis* (0,95%), *Micrurus* (0,36%) e *Bothrops* (0,31%). Em boa parte dos óbitos (aproximadamente 19%) não são especificados os gêneros das serpentes (Bochner, 2001).

Tabela 1. Acidentes causados por serpentes no mundo (tabela extraída de Stock, Massougbdji et al. (2007), modificada).

Região	População (x10 ⁶)	Acidentes	Envenenamentos	Mortes	Mortalidade (%)
Europa	750	25000	8000	30	0,38
Oriente Médio	160	20000	15000	100	0,6
USA/Canadá	270	45000	6500	15	0,23
América Latina	400	300000	150000	5000	3,3
África	800	1000000	500000	20000	4
Ásia	3500	4000000	2000000	100000	5
Oceania	20	10000	3000	200	6,6
Total	5900	5400000	2682500	125344	4,7

Os sintomas clínicos do envenenamento por *Lachesis* e *Bothrops* são semelhantes e geralmente caracterizados por dor, edema, hemorragia e necrose no local da picada. Algumas complicações sistêmicas ainda podem estar envolvidas, como disfunções cardiovasculares e da coagulação, hemólise e falha dos rins (Soares de Moura et al., 1998). Na região amazônica, a maior parte dos envenenamentos por serpentes é causada por *Bothrops*. No entanto, devido à semelhança entre os sintomas, acidentes causados por

Lachesis são frequentemente tratados com antivenenos produzidos contra *Bothrops*, o que pode diminuir a eficiência do tratamento (Colombini et al., 2001). Diferentemente, o principal sintoma observado nos envenenamentos por *Crotalus* e *Micrurus* é a falha respiratória aguda, relacionada à paralisia neuromuscular (Damico et al., 2005a; Dokmetjian et al., 2009). Apesar de os acidentes laquéticos não serem tão freqüentes, eles são particularmente complicados devido ao fato de as serpentes serem grandes e, conseqüentemente, injetarem grande quantidade de peçonha (Sanchez et al., 1995).

As peçonhas de serpentes resultam da interação de múltiplos componentes que levam a um produto biológico eficiente e têm, como objetivos, a imobilização, morte, digestão inicial de presas, entre outros (Kochva et al., 1983; Zelanis et al., 2007). Essa composição varia entre famílias, gêneros e mesmo entre espécies. Isso pode ocorrer devido a variações genéticas, características da síntese de proteínas específicas ou fatores externos como condições do habitat, clima, idade e hábitos alimentares. A caracterização dos peptídeos e proteínas presentes nas peçonhas é de suma importância para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de envenenamentos (Dokmetjian et al., 2009; Kuch et al., 1996).

De acordo com a toxicidade, as peçonhas de serpentes podem ser convenientemente classificadas como neurotóxicas e anti-hemorrágicas. Em relação ao primeiro grupo, a família *Elapidae* possui uma larga variedade de isozimas do grupo I de fosfolipases A2, entre outras proteínas e peptídeos também envolvidos com a ação neurotóxica. Já em relação ao segundo grupo, serpentes das famílias *Viperidae* e *Crotalidae* possuem diversas proteínas que interferem na cascata de coagulação, no sistema homeostático e no reparo tecidual. Entre elas, podemos citar enzimas como serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido-oxidases, fosfolipases A2 do grupo II e proteínas sem atividade enzimática, como lectinas, miotoxinas, desintegrinas, inibidores, entre outras (Espino-Solis et al., 2009).

Uma característica marcante na peçonha de *Lachesis* é a grande quantidade de enzimas proteolíticas, que podem interferir em processos como coagulação sanguínea, liberação de bradicinina, hemorragias e neurotoxicidade. Outras enzimas com elevado nível de atividade também estão presentes na peçonha dessa espécie, como a arginil éster hidrolase e isoformas de PLA₂ (Campos et al., 2009; Diniz and Oliveira, 1992; Sanchez et al., 1995). Além disso, os níveis das atividades pró-coagulante, proteolítica e fosfolipásica são geralmente mais altos do que aqueles encontrados para serpentes do gênero *Bothrops* (Ferreira et al., 2009).

Serinoproteases presentes nas peçonhas de diferentes serpentes geralmente apresentam características estruturais semelhantes, entretanto, podem apresentar perfil farmacológico bastante diverso e atuar em diferentes processos fisiológicos (Vilca-Quispe et al., 2010). Essa classe de enzimas possui um sítio catalítico que contém um resíduo de serina altamente reativo, além de resíduos de histidina e aspartato que atuam estabilizando o resíduo de serina (Serrano and Maroun, 2005). Metaloproteases também estão presentes nas peçonhas de muitas serpentes, inclusive aquelas da espécie *L. muta*. Essas metaloproteases estão diretamente envolvidas com a ação hemorrágica da peçonha, fato comprovado pela utilização de inibidores específicos (Sanchez et al., 1995).

Fosfolipases também representam uma importante classe de enzimas encontradas em peçonhas ofídicas. Fosfolipases A₂ (PLA₂) (EC 3.1.1.4) são esterases dependentes de cálcio que catalisam a hidrólise da segunda ligação éster em 1,2-diacil-3sn-fosfoglicerídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos, também chamados de lisofosfatidilcolina ou lisolecitina (da Silva Cunha et al., 2011; Fuly et al., 2000). Fosfolipases A₂ extracelulares são divididas em três grupos de acordo com sua estrutura primária. Aquelas encontradas nas peçonhas de serpentes das famílias *Viperidae* e *Crotalidae* pertencem ao grupo II. Isoformas de PLA₂ constituem o principal componente tóxico de muitas peçonhas e, além do seu provável papel na digestão da presa, PLA₂s interferem em funções fisiológicas importantes e induzem ações farmacológicas como neurotoxicidade pré-sináptica, miotoxicidade, dificultam a coagulação e a agregação de plaquetas, têm efeitos convulsivos, inflamatórios, hipotensivos, hemolíticos, hemorrágicos e induzem edemas (Campos et al., 2009; Fortes-Dias et al., 1999; Fuly et al., 2007; Huang et al., 1997). Presentes naturalmente, sob condições anormais, PLA₂ e seus produtos de hidrólise estão envolvidos com processos de inflamação nervosa, estresse oxidativo e danos neuronais, podendo ainda estar relacionados a doenças como Alzheimer e Parkinson, quando presentes em excesso (da Silva Cunha et al., 2011).

L-aminoácido oxidases (EC1.4.3.2), conhecidas por LAAO, também são importantes componentes de peçonhas de serpentes de diversas espécies. São flavoenzimas que catalisam uma reação estereoespecífica de deaminação oxidativa de L-aminoácidos, liberando o α -cetoácido correspondente, amônia e peróxido de hidrogênio. São glicoproteínas normalmente encontradas na forma dimérica, associadas a um cofator que pode ser FAD ou FMN. Como dímeros possuem peso molecular que varia de 110 a 150 kDa,

sendo que cada monômero possui cerca de 50 a 70 kDa (Du and Clemetson, 2002). Acredita-se que essas enzimas estejam envolvidas em processos de apoptose de vários tipos celulares, como células do endotélio vascular (Alves et al., 2008; Suhr and Kim, 1996). Além disso, interferem em processos de agregação plaquetária, e possuem efeito anticoagulante (Sakurai et al., 2003). Alguns pesquisadores demonstraram seu efeito citotóxico sobre células tumorais (Ahn et al., 1997). Também já foram demonstrados efeitos microbicidas, antimicóticos e leishmanicidas (Ciscotto et al., 2009; Costa Torres et al.).

1.2. Soroterapia

Um dos primeiros experimentos envolvendo imunização de animais foi conduzido por Henry Sewall em 1887, nos Estados Unidos. O pesquisador imunizou pombos através de injeções sucessivas de uma mistura de glicerina e peçonha da serpente *Sistrurus catenatus*. Os pombos imunizados tornaram-se capazes de resistir a mais de seis vezes a dose letal média da peçonha (Espino-Solis et al., 2009).

Albert Calmette também realizou experimentos de extrema importância na área. Após um grande número de acidentes envolvendo serpentes da espécie *Naja tripudians* em uma vila chinesa, em 1891, alguns exemplares da espécie foram enviados para uma filial recém criada do Instituto Pasteur, em Saigon, onde ele trabalhava (Hawgood, 1999). Inspirado pela descoberta de uma antitoxina contra a difteria por Emil Behring (von Behring and Kitasato, 1890), ele começou, então, seus estudos sobre o tema. Em 1894, na França, Calmette conseguiu produzir antissoros capazes de neutralizar a toxicidade das peçonhas em ensaios *in vitro* e *in vivo* após sucessivas injeções de doses de peçonha em coelhos (Hawgood, 1999). No mesmo ano, Phisalix e Bertrand, também na França, mostraram que o soro de animais vacinados com peçonha pré-aquecida de *Vipera berus* era capaz de promover resistência contra aquela peçonha (Hawgood, 1992). Calmette também estudou as peçonhas das serpentes *Hoplocephalus curtus* e *Pseudechis porphyriacus* e verificou que um animal imunizado contra a peçonha de uma serpente também estava protegido contra a peçonha da outra, indicando que não havia especificidade no antiveneno (Hawgood, 1999).

Na década de 1890, no Brasil, Vital Brazil começou a estudar diferenças nas ações fisiológicas das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. Nessa época, começou a testar remédios para o tratamento de envenenamentos por essas serpentes,

inclusive extratos de plantas popularmente utilizados, porém, não obteve sucesso. Inspirado pelo trabalho de Albert Calmette sobre a neutralização da peçonha de *Naja* utilizando técnicas de soroterapia, ele iniciou estudos na área visando à produção de antivenenos (Hawgood, 1992). Demonstrou, inclusive, que o antiveneno produzido por Calmette contra a peçonha de *Naja* não oferecia resistência contra as peçonhas de cascavel e jararaca e, testando dois antissoros produzidos em seu laboratório contra as peçonhas de *Bothrops* e *Crotalus*, demonstrou a ação específica dos antivenenos e a importância de soros polivalentes (Hawgood, 1992, 1999). Em 1901, no recém fundado Instituto Butantan, anunciou a produção de um soro polivalente constituído de uma mistura dos soros anticrotálico e antibotrópico. Em 1910, foi produzido soro antielapídico, também no Butantan. Mais tarde, Brasil confirmou que as antitoxinas estavam presentes na fração de globulinas do soro e introduziu processos de purificação e concentração dos antivenenos (Hawgood, 1992). No país, o Instituto Butantan é responsável pela produção de diversos soros, inclusive o antilaquético. A Fundação Ezequiel Dias (Funed) e o Instituto Vital Brazil também produzem soros antiofídicos (Espino-Solis et al., 2009; Instituto Vital Brazil, 2010).

A indicação ou não do tratamento com antiveneno deve levar em conta o tempo entre a picada e a entrada no hospital, o local da picada, os sintomas sistêmicos primários e a acessibilidade a unidades de tratamento hospitalares (Chippaux and Goyffon, 1998). Atualmente, os antivenenos ainda são preparados mediante hiperimunização de animais, geralmente cavalos, burros e ovelhas, e posterior purificação das imunoglobulinas. Além de imunoglobulinas intactas, diferentes formatos também podem ser utilizados, como, Fab monovalentes e $F(ab')_2$ divalentes (Figura 3), nos quais foram observadas reduzidas reações adversas associadas à administração do antissoro (Espino-Solis et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). Como muitas das toxinas possuem massa molecular menor do que os anticorpos neutralizantes e, conseqüentemente, distribuem-se mais rápido pelos tecidos, a administração intravenosa é usualmente recomendada (Riviere et al., 1997). A administração intramuscular é menos eficiente, porém, também costuma eliminar os efeitos tóxicos. A injeção subcutânea no local da picada deve ser evitada. Além de causar dor, não é eficiente e pode gerar complicações locais (Chippaux and Goyffon, 1998).

Figura 3. Representação de imunoglobulina intacta e fragmentos de anticorpos (Espino-Solis et al., 2009).

Apesar da comprovada eficácia da imunoterapia na redução da mortalidade e da morbidade, o tratamento pode ser responsável por reações de hipersensibilidade. A incidência dessas reações depende principalmente da quantidade de anticorpos heterólogos injetados e da pureza do antiveneno (Riviere et al., 1997). Podem ocorrer devido à administração de proteínas estranhas ao organismo, caracterizando reações de hipersensibilidade do tipo I não específicas para o antiveneno. A intensidade da reação, nesse caso, é proporcional à quantidade de proteínas injetadas. Também podem ocorrer reações de hipersensibilidade dos tipos III ou IV. Aquelas são caracterizadas por serem imediatas enquanto estas são do tipo tardia, como por exemplo, a doença do soro. Situações mais graves podem resultar em choque anafilático (Chippaux and Goyffon, 1998). Outros animais já foram utilizados para a produção de antivenenos visando diminuir as reações adversas, porém, os resultados não foram animadores (Riviere et al., 1997). Além disso, apenas uma parte dos anticorpos presentes no antiveneno, cerca de 20%, é específica para componentes da peçonha (Riviere et al., 1997) e, ainda, boa parte destes pode ser específica para componentes não tóxicos.

Visando diminuir a imunogenicidade de anticorpos monoclonais heterólogos, foram desenvolvidas técnicas para a construção de anticorpos híbridos. Anticorpos quiméricos são construídos a partir da substituição dos genes correspondentes às regiões variáveis das

cadeias leve e pesada do anticorpo humano por genes de roedores codificadores das regiões variáveis específicos para um antígeno alvo. A porção constante é mantida humana enquanto a sequência variável não, resultando em anticorpos monoclonais quiméricos que mantêm 60-70% de genes humanos. (Roque et al., 2004). Estima-se que a região constante contribua com 90% da imunogenicidade de anticorpos quiméricos enquanto a porção variável, com 10%. No entanto, esses anticorpos ainda podem apresentar certa imunogenicidade (Maynard and Georgiou, 2000). O desenvolvimento e o aperfeiçoamento de outras técnicas ainda são importantes áreas de estudo para se tentar contornar alguns pontos negativos da soroterapia convencional.

1.3. Phage Display

Bacteriófagos são vírus capazes de infectar bactérias e promover a multiplicação dos vírions (partículas virais completas) utilizando o aparato celular bacteriano. Na maioria das vezes, a liberação dos vírions resulta em lise celular, porém, em alguns casos, as partículas virais são liberadas continuamente sem que haja lise, como é o caso do fago filamentosso M13, formado por uma fita simples de DNA recoberta por um capsídeo protéico (Azzazy and Highsmith, 2002; Carter and Saunders, 2007).

Fagos filamentosos possuem um gene (gene III) que codifica uma proteína do capsídeo, pIII. A porção aminoterminal dessa proteína está envolvida na ligação do vírus ao F pilus bacteriano, durante a infecção, e a porção carboxiterminal está ligada ao capsídeo e participa da morfogênese. Uma sequência heteróloga de DNA pode ser inserida entre os dois domínios sem que haja perda de função da proteína pIII e a sequência codificada é apresentada de forma acessível na partícula infecciosa (Smith, 1985). Após ancoramento da proteína pIII no F pilus de uma bactéria *Escherichia coli*, a fita simples de DNA circular do vírus penetra na bactéria, onde é convertida em fita dupla (forma replicativa), utilizando a maquinaria de replicação do hospedeiro. A forma replicativa serve de molde para a síntese de novas sequências de DNA fita simples e para a expressão de proteínas virais. A montagem de novos fagos é feita através do empacotamento da fita simples de DNA pelas proteínas do capsídeo e posterior liberação dos vírions no meio (Azzazy and Highsmith, 2002). A sequência de DNA heteróloga também pode ser inserida no gene que codifica outra proteína

do capsídeo viral, a proteína pVIII (Sidhu, 2001). Um fator limitante à inserção do DNA heterólogo é o seu tamanho. Geralmente, peptídeos pequenos com menos de 10 resíduos de aminoácidos são expostos na partícula viral de forma eficiente. Esse problema pode ser superado através da utilização de fagomídeos (Sidhu, 2000).

Fagomídeos são construídos para conter tanto a origem de replicação do fago M13 quanto da bactéria *E. coli* no gene III, múltiplos sítios de clonagem, genes de resistência a antibióticos e um sinal de empacotamento (Azzazy and Highsmith, 2002; Paschke, 2006; Russel and Model, 1989). Entretanto, alguns genes que codificam proteínas estruturais e não estruturais necessárias para a montagem do vírion não estão presentes no seu genoma. Então, após infecção, eles podem ser mantidos como plasmídeos ou podem ser montados como fagos M13 recombinantes, com a ajuda de um fago auxiliar, como VCS-M13 ou M13KO7. O fago auxiliar apresenta um defeito na origem de replicação, porém, supre as demais proteínas não expressas pelo fagomídeo, necessárias para a montagem de uma partícula viral completa. O fago resultante pode incorporar tanto a proteína pIII selvagem, proveniente do fago auxiliar quanto a proteína pIII híbrida, proveniente do fagomídeo (Azzazy and Highsmith, 2002).

Figura 4. Representação de um fago filamentososo (Carter and Saunders, 2007).

Na técnica de *Phage Display*, a sequência de DNA heteróloga é incorporada em um gene que codifica uma das proteínas do capsídeo viral, pIII ou pVIII. Dessa forma, o peptídeo de interesse é fusionado à proteína do capsídeo para formar uma proteína híbrida. Essa proteína híbrida é incorporada aos vírions assim que eles são liberados do hospedeiro e o peptídeo de interesse é apresentado na superfície externa do vírus (Paschke, 2006). A técnica pode ser eficientemente utilizada para a produção de peptídeos e proteínas (Liu et

al., 2009), para a seleção de enzimas com afinidade para substratos específicos (Iwamoto et al., 2009), para o estudo de sítios de ligação de anticorpos (Winter et al., 1994), para a seleção de fragmentos de anticorpos contra alvos específicos, como componentes tóxicos de peçonhas animais (Kulkeaw et al., 2009; Mousli et al., 1999; Tamarozzi et al., 2006), entre outras aplicações.

Uma biblioteca de fagos é uma mistura de clones, sendo que cada um contém uma sequência diferente de DNA de interesse em seu genoma e, portanto, expressa um peptídeo diferente em sua superfície. A técnica de *Phage Display* de anticorpos permite a seleção de fagos-anticorpos específicos, os quais são capazes de se ligar a um antígeno de interesse com alta afinidade a partir de uma biblioteca com um repertório de fagos-anticorpos muito maior, que não são capazes de se ligar ou se ligam com menor afinidade. O antígeno alvo pode ser uma proteína, purificada ou não, imobilizada em um suporte sólido ou expressa na superfície de células (Smith et al., 2005). Em se tratando de suportes sólidos, é comum a utilização de colunas de afinidade e superfícies plásticas como imuntubos ou placas de ELISA. Após incubação com a biblioteca, os fagos-anticorpos que não se ligaram ou se ligaram fracamente podem ser lavados e aqueles que apresentaram maior afinidade e, conseqüentemente, permaneceram ligados, podem ser eluídos com soluções ácidas ou básicas. Visando à obtenção de um maior número de fagos-anticorpos específicos para o antígeno e um menor número de fagos-anticorpos inespecíficos, pode ser conduzido mais de um ciclo de seleção, geralmente 2 a 4 (Azzazy and Highsmith, 2002; Zani and Moreau, 2010). Além disso, mutações pontuais na sequência gênica de cada clone podem aumentar ou diminuir a afinidade do fago-anticorpo pelo antígeno alvo.

A produção de fragmentos de anticorpos solúveis scFvs pode ser feita mediante infecção de outra linhagem de *E. coli* a partir dos fagos-anticorpos selecionados contra o antígeno alvo. É comum a utilização da linhagem não supressora HB2151 (Kulkeaw et al., 2009; Li and Aitken, 2004; Mousli et al., 1999). Nesse hospedeiro, um códon de terminação localizado entre as sequências gênicas que codificam o scFv e a proteína viral pIII é lido e finaliza a transcrição, diferentemente do que ocorre na linhagem supressora TG1, em que o códon não é reconhecido e a bactéria expressa o scFv fusionado à proteína pIII (Li and Aitken, 2004).

Fragmentos de anticorpos podem ser produzidos para apresentar tamanhos e formatos diferentes, como Fab, scFv, entre outros, conforme pode ser observado na Figura 3. A

molécula de Fab é formada pelas cadeias variável pesada e constante pesada unidas às cadeias variável leve e constante leve (V_H-C_H e V_L-C_L). A molécula de scFv é formada pelas cadeias variáveis leve e pesada (V_L e V_H) unidas artificialmente por um peptídeo, chamado *linker*, que permite a associação das cadeias para formar o sítio de ligação ao antígeno (Azzazy and Highsmith, 2002). Um importante fator para a manutenção da estabilidade dos anticorpos, intactos ou fragmentos, é a presença de ligações dissulfeto (Paschke, 2006). O periplasma é, então, um ambiente interessante para o direcionamento dessas proteínas visto que é um ambiente oxidante e que contém enzimas capazes de catalisar a formação e o rearranjo de ligações dissulfeto (Baneyx, 1999). Considerando-se que o periplasma contenha somente uma pequena parte do total de proteínas celulares, a purificação de proteínas desse ambiente é mais fácil quando comparada com a purificação a partir de outros ambientes (Pluckthun, 1991). Adicionalmente, os fragmentos de anticorpos scFvs podem ser engenheirados para apresentar uma marcação, por exemplo uma cauda de polihistidina que apresenta forte interação por matrizes de íons metálicos imobilizados, o que permite a purificação por técnicas eficientes como cromatografia de afinidade (Roque et al., 2004).

Técnicas de produção de anticorpos monoclonais permitiram o desenvolvimento de diversas imunoglobulinas, incluindo algumas para uso em humanos. Em 1986, a FDA (Food and Drug Administration, EUA) aprovou a utilização de um anticorpo murino, Orthoclone OKT3 (Johnson & Johnson, EUA) para o tratamento contra a rejeição de órgãos transplantados em humanos. No entanto, apesar dos efeitos benéficos, esse medicamento também é capaz de gerar efeitos indesejáveis como febre e reações alérgicas. Desde então, a FDA aprovou diversos outros anticorpos para uso terapêutico em humanos e muitos outros entraram em fase de testes clínicos. Em 2002 a FDA aprovou o uso do medicamento Humira (Abbot Laboratories, EUA) para o tratamento de doenças auto-imunes (Espino-Solis et al., 2009). Trata-se de um anticorpo monoclonal da imunoglobulina recombinante humana IgG1 com especificidade para o fator de necrose tumoral humano (TNF), produzido pela tecnologia de *Phage Display* (Abbott Laboratories, 2004).

A utilização de anticorpos em técnicas de soroterapia foi primeiramente reportada em 1894 e, atualmente, ainda é o tratamento preferencial utilizado nos acidentes envolvendo animais peçonhentos. No entanto, a produção desses anticorpos em animais imunizados apresenta certas dificuldades. Além do dano animal, a produção é um procedimento caro,

demorado, de difícil reprodutibilidade, o tempo de meia vida no organismo é curto e há risco de serem imunogênicos (Ciscotto et al., 2009; Maynard and Georgiou, 2000). A técnica de *Phage Display* permite mimetizar a estratégia usada pelo sistema imune humoral para produzir anticorpos, completos ou fragmentos, totalmente humanos e, ainda, evita a imunização de animais e a construção de hibridomas (Roque et al., 2004). Além disso, o tamanho reduzido de fragmentos de anticorpos scFvs permite rápida difusão e rápida liberação de imunocomplexos (Maynard and Georgiou, 2000). Dessa forma, a técnica de *Phage Display* é promissora para a superação de alguns dos problemas associados às técnicas de soroterapia convencionais.

2. Justificativa

O número de acidentes ofídicos no mundo é estimado em 5,4 milhões, dos quais mais de 120 mil resultam em morte, anualmente. No Brasil, foram registrados 26156 e 27655 acidentes em 2008 e 2009, respectivamente, e 119 e 125 óbitos. No país, o gênero *Lachesis* é responsável pela segunda maior taxa de letalidade entre os acidentes ofídicos e o tratamento preferencial para esse tipo de acidente é a administração intravenosa do antiveneno. Ainda hoje, os antivenenos são preparados através da hiperimunização de animais e purificação das imunoglobulinas, assim como era feito no início do século XX. No entanto, essa técnica apresenta algumas desvantagens: a quantidade de proteínas injetadas é alta; apenas uma parte dos anticorpos é específica para componentes da peçonha; a produção de anticorpos em animais é cara, de difícil reprodutibilidade e o tempo de meia vida no organismo é curto. Além disso, o tratamento pode ser responsável por reações de hipersensibilidade, podendo levar a quadros clínicos graves.

A técnica de *Phage Display* permite a seleção de fagos-anticorpos específicos, os quais são capazes de se ligar a um antígeno de interesse com alta afinidade. É possível mimetizar a estratégia usada pelo sistema imune humoral para produzir anticorpos, completos ou fragmentos, totalmente humanos e, ainda, evitar a imunização de animais e a construção de hibridomas. Dessa forma, a técnica de *Phage Display* é promissora para a superação de alguns dos problemas associados às técnicas de soroterapia convencionais.

3. Objetivos

Este projeto teve como principais objetivos a avaliação da atividade de enzimas responsáveis por parte da toxicidade da peçonha de serpentes da espécie *Lachesis muta rhombeata* e a produção de fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv capazes de reconhecer componentes da peçonha.

Os objetivos específicos foram:

- Padronizar ensaios para avaliar as atividades de fosfolipase A2, protease e L-aminoácido oxidase da peçonha;
- Otimizar a metodologia para determinação da atividade de protease;
- Selecionar fagos-anticorpos monoclonais capazes de reconhecer a peçonha bruta de serpentes do gênero *Lachesis*;
- Produzir e purificar fragmentos de anticorpos humanos a partir dos clones selecionados;
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade de inibição da proteólise, da hemólise e da atividade de L-aminoácido oxidase da peçonha pelos fragmentos de anticorpos purificados.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais e peçonha

A peçonha bruta de *Lachesis muta rhombeata* foi cedida pela equipe do Serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto – SP, Brasil. A peçonha foi retirada do acervo do serpentário na forma liofilizada, ressuspendida em água deionizada, aliquotada e estocada a -20°C. As hemácias foram coletadas de camundongos swiss fêmeas com o peso entre 15 e 25 g cedidos pelo Biotério Central da FMRP. O protocolo n.º 130/2010 de experimentação animal do referente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (documento em anexo).

4.2. Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas segundo protocolo descrito por Lowry, modificado por Hartree (1972) e adaptado para um leitor de placas (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) (Sigma®, St. Louis, EUA) como padrão.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas da peçonha e os fragmentos de anticorpos scFvs foram analisados por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8%, Sigma®, St Louis, EUA), conforme descrito por Laemmli (1970). Amostras de 1,5 e 3,0 µg de peçonha bruta foram preparadas na presença e ausência de agentes redutores (β-mercaptoetanol) em tampão de amostra contendo SDS. Os fragmentos de anticorpo foram preparados em tampão de amostra na ausência de agentes redutores. As amostras foram submetidas a uma diferença de potencial de 90 V e, após a corrida, os géis foram corados com prata, conforme protocolo descrito por Sambrook et al. (2001). A massa molecular das proteínas foi estimada por comparação com um padrão de peso molecular (PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas International Inc, Canada).

4.4. Conjugação de IgG à peroxidase

Os anticorpos do tipo IgG foram produzidos no laboratório por Soares (2005). Resumidamente, os anticorpos foram coletados de um coelho previamente imunizado com VCS-M13, concentrados com ácido caprílico e purificados parcialmente em uma coluna de proteína A.

A conjugação foi feita conforme protocolo descrito no Handbook of Experimental Immunology (Weir, 1996). Três miligramas de peroxidase (No. P-8375 tipo VI, Sigma®, Saint Louis, EUA) foram diluídos em 400 µL de tampão carbonato-bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) 300 mM pH 8,0 e a solução foi incubada por 10 minutos sob agitação suave. Foram adicionados 46,5 µL de fluordinitrobenzeno 1%, diluído em etanol (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil), e a solução foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e agitação suave. A coloração marrom ficou mais clara. Foram adicionados 600 µL de periodato de sódio (Synth®, São Paulo, Brasil) 60 mM e a solução foi mantida por mais 30 minutos à temperatura ambiente e agitação suave. Foi possível perceber que a solução ficou esverdeada. Foram adicionados 75 µL de propilenoglicol (Synth®, São Paulo, Brasil) 10% diluído em água e a amostra foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e repouso. A amostra foi passada em uma coluna de exclusão molecular G-25 (GE Healthcare, Reino Unido) para remover os sais e o tampão foi substituído por carbonato-bicarbonato 10 mM pH 9,5. O tampão da amostra de IgG também foi substituído por aquele descrito acima em um sistema de concentração em Falcon com membrana de 10 kDa (Millipore, Billerica, EUA). Aproximadamente 4 mg (500 µL) de IgG foram misturados com as frações de peroxidase obtidas da gel filtração e a mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente, com agitação manual a cada 15 minutos. Foram adicionados 2,0 mg de boridreto de sódio (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) e a solução foi incubada por 16 horas a 4°C, sem agitação. A amostra de peroxidase, agora conjugada ao anticorpo, foi novamente passada na coluna de exclusão molecular e o tampão foi substituído por carbonato-bicarbonato 150 mM pH 8,0. As frações com atividade de peroxidase foram misturadas com glicerol (J.T.Baker, Phillipsburg, EUA) para concentração final de 30% (v/v), foram aliquotadas e armazenadas a -20°C. É importante salientar que todas as etapas da conjugação foram feitas protegidas da luz.

4.5. Ensaio de atividade fosfolipásica

A atividade de PLA₂ foi avaliada através de reações de hemólise indireta de hemácias na presença de cloreto de cálcio. Foi usada gema de ovo como substrato para o desenvolvimento de um ensaio turbidimétrico (ensaio cinético) e um colorimétrico (ensaio de ponto final). Ambos são baseados na capacidade de as PLA₂s hidrolisarem fosfatidilcolina, presente na gema de ovo, liberando ácidos graxos e lisofosfatidilcolina, a qual se acumula na membrana de eritrócitos e promove o seu rompimento (Bierbaum et al., 1979). As análises estatísticas foram feitas com auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 5.00. Os resultados estão apresentados como médias, as quais foram avaliadas por ANOVA (análise de variância) e pós teste de Bonferroni ou Tukey.

4.5.1. Ensaio cinético de hemólise indireta

O ensaio cinético foi conduzido em uma placa de ELISA (Costar®, Corning Incorporated, NY, EUA, fundo plano, 96 poços) incubada a 37°C sem agitação. As leituras foram feitas em intervalos de 5 ou 10 minutos em comprimento de onda de 700 nm, o qual está fora da faixa de absorção da hemoglobina e cuja absorvância é diretamente proporcional à concentração de células (Polhill et al., 1978). Foi preparada uma solução de hemólise na seguinte proporção: 3 mL de tampão Tris-HCl (Sigma®, St. Louis, EUA) 10 mM pH 7,4, NaCl (Sigma®, St. Louis, EUA) 140 mM e CaCl₂ (Mallinckrodt Baker, Avantor, Phillipsburg, EUA) 2,5 mM acrescido de 1,5 µL de concentrado de hemácias lavadas com PBS e 25 µL de gema de ovo diluída 1:4 (v/v) em solução salina. Diferentes quantidades de peçonha foram adicionadas a 175 µL da solução de hemólise para um volume final de 200 µL e concentrações finais de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL. Foram definidas as doses mínimas capazes de gerar hemólise aparente. Como controle negativo, utilizou-se solução salina em vez de peçonha e, como branco, foi preparada uma solução de hemólise com excesso de peçonha (50 µg/mL). O branco foi incubado por 1 hora a 37°C e, então, utilizado para zerar o aparelho.

4.5.2. Ensaio de hemólise indireta de ponto final

O ensaio de ponto final foi preparado em microtubos do tipo *eppendorf* (2,0 mL, Axygen, California, EUA), incubados por 1 hora a 37°C, sem agitação. Eritrócitos que permaneceram intactos foram removidos por centrifugação (Microfuge ETM, Beckman®, Palo Alto, EUA) durante 10 minutos a 11600 xg e a hemoglobina em solução, proveniente dos eritrócitos que sofreram lise, foi avaliada no sobrenadante através de leitura em espectrofotômetro (Bioespectro®, Espectrofotômetro SP22) ajustado para 412 nm. Foi preparada uma solução de hemólise na seguinte proporção: 10 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 140 mM e CaCl₂ 2,5 mM acrescido de 3,0 µL de concentrado de hemácias lavadas e 50 µL de gema de ovo diluída 1:4 (v/v) em solução salina. Diferentes quantidades de peçonha foram adicionadas a 900 µL de solução de hemólise para um volume final de 1000 µL e concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 µg/mL. Como controle negativo (também usado como branco), utilizou-se solução salina em vez de peçonha.

4.5.3. Zimograma para atividade de PLA₂

Para confirmar a presença de fosfolipases e estimar suas massas moleculares, foi feito um zimograma conforme descrito por Rossignol et al. (2008), modificado. A peçonha foi preparada em tampão de amostra contendo SDS (amostras de 1,25 e 2,5 µg/poço), na ausência de agentes redutores, e submetida a uma corrida eletroforética a 60 V e 4°C em um gel de poliacrilamida 12%. Após a corrida, o gel foi lavado 3 vezes em agitador do tipo gangorra (Difusion-Destaining-Apparatus, Desaga, Wiesloch, Alemanha): primeiro, em tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 (Inlab, São Paulo, Brasil) 1,0% (v/v) por 1 hora; depois, em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 1,0% (v/v) por 1 hora e, por último, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 140 mM e CaCl₂ 2,5 mM por 30 minutos. O gel foi cortado de forma a separar a canaleta correspondente ao marcador de peso molecular das amostras de peçonha. A porção contendo o marcador foi corada por prata, conforme descrito por Sambrook et al. (2001), e a porção contendo peçonha foi colocada sobre um gel de agarose (Sigma®, St. Louis, EUA) 1% preparado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM e gema de ovo 2,5%

(v/v). O gel foi incubado por 2 horas a 37°C, tempo suficiente para o aparecimento de bandas claras indicando a presença de fosfolipases.

4.6. Ensaio de atividade proteolítica

A medida de atividade de protease foi baseada na quantificação de peptídeos presentes no meio de reação após a hidrólise do substrato. Para os experimentos a seguir, as reações foram conduzidas em microtubo de 2,0 mL contendo 500 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 acrescido de NaCl 100 mM, CaCl₂ 2,0 mM e substrato 5 mg/mL, a não ser que seja citada outra informação. Após incubação por 3 horas em repouso a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) (Synth®, São Paulo, Brasil) 10% (p/v) e o meio de reação foi incubado por 10 minutos a 4°C. Proteínas que não sofreram ou sofreram pouca hidrólise foram removidas por centrifugação a 11600 xg por 5 minutos e o conteúdo de peptídeos em solução no sobrenadante limpo foi avaliado em espectrofotômetro ajustado para 280 nm (Beckman, D.U. 640, Palo Alto, EUA).

4.6.1. Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha

Três diferentes concentrações finais de peçonha (25,0; 62,5 e 125 µg/mL) foram avaliadas em meio de reação contendo BSA como substrato. O controle negativo foi preparado com tampão em vez de peçonha e também foi utilizado como branco. Também foi feito um controle com a peçonha (62,5 µg/mL) desnaturada antes da adição do substrato para verificar se a quantidade de peçonha adicionada seria responsável por alterações significativas na leitura. Para isso, adicionou-se TCA 10% (p/v) antes do substrato.

4.6.2. Ensaio de proteólise variando-se o modo de preparo do substrato

Visando a otimizar o protocolo para medida de atividade proteolítica, foi feito um teste com o substrato preparado de formas diferentes. Preparou-se uma solução estoque de BSA 10 mg/mL apenas dissolvendo o substrato em água deionizada. O substrato também foi preparado e desnaturado mediante elevação do pH até aproximadamente 12 com adição de NaOH (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) e, após cerca de 10 minutos, o pH foi

reajustado para aproximadamente 7 com adição de HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha). As soluções não foram tamponadas e, para ambos os casos, a concentração no meio de reação foi de 5 mg/mL. Optou-se por utilizar peçonha na concentração de 50 µg/mL. Para cada substrato foi feito um controle negativo com tampão em vez de peçonha e foi utilizado água como branco.

4.6.3. Ensaio de proteólise variando-se a temperatura

Foram feitos ensaios de proteólise com incubação do meio de reação a 30, 37 e 40°C para verificar se essas temperaturas acarretariam em valores de absorvância significativamente diferentes daqueles encontrados em temperatura fisiológica (37°C). Optou-se por usar BSA previamente desnaturado como substrato e peçonha na concentração de 50 µg/mL. O controle negativo foi preparado com tampão em vez de peçonha e, como branco, utilizou-se água.

4.6.4. Ensaio de proteólise variando-se o substrato

Como a quantidade de peçonha utilizada em cada ensaio ainda era elevada, optou-se por testar outros substratos. Uma solução estoque de caseína (Synth®, São Paulo, Brasil) 10 mg/mL foi preparada em água. O pH foi primeiramente ajustado para próximo de 12 e, posteriormente, para próximo de 7 (olhar item 4.6.2). O substrato foi adicionado ao meio de reação para uma concentração final de 5 mg/mL. Além da caseína, foi preparada uma solução de bactogelatina (Difco, Franklin Lakes, EUA) 5 mg/mL (concentração no meio de reação, 2,5 mg/mL). Ambos os substratos foram comparados com BSA desnaturado 5 mg/mL. Nesse experimento, optou-se por utilizar peçonha na concentração de 20 µg/mL. Foram preparados controles negativos com tampão em vez de peçonha para cada substrato e, como branco, utilizou-se água.

4.6.5. Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha

Escolhida a caseína desnaturada como substrato, foi necessário padronizar novamente as concentrações de peçonha capazes de promover atividade de protease evidente. Quatro

concentrações diferentes de peçonha (5,0; 10; 20 e 30 µg/mL) foram incubadas em meio de reação contendo caseína desnaturada 5 mg/mL como substrato. O controle negativo foi preparado com tampão em vez de peçonha e, como branco, utilizou-se água.

4.6.6. Ensaio de inibição da proteólise com PMSF e EDTA

Para verificar o(s) tipo(s) de protease(s) presente(s) na peçonha, foi feito um ensaio na presença dos inibidores PMSF (Sigma®, St. Louis, EUA) (inibidor de serinoproteases) e EDTA (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil) (inibidor de metaloproteases) nas concentrações de 1, 2 e 4 mM. Os inibidores foram avaliados de forma separada e em associação. Optou-se por utilizar peçonha na concentração de 15 µg/mL. Com o intuito de verificar se os inibidores poderiam gerar alterações consideráveis na absorvância, para cada concentração de inibidor foi preparado um controle negativo com a peçonha desnaturada com TCA 10% antes da adição do substrato. Também foi preparado um controle negativo com tampão em vez de peçonha e, como branco, utilizou-se água. O controle positivo foi preparado com peçonha incubada na ausência de inibidores.

4.6.7. Zimograma para atividade de protease

Para confirmar a presença de proteases e estimar seus pesos moleculares, foi feito um zimograma conforme descrito por Zelanis et al. (2007), modificado. A peçonha foi preparada em tampão de amostra contendo SDS (amostras de 10, 40 e 100 µg/poço), na ausência de agentes redutores, e submetida a uma corrida eletroforética a 60 V e 4°C em um gel de poliacrilamida 12% contendo caseína 0,07 % (p/v). Após a corrida, o gel foi lavado por 30 minutos, em agitador do tipo gangorra, à temperatura ambiente, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 1,0% (v/v). O tampão foi substituído e o gel lavado por mais 30 minutos. Removidos os traços de SDS, o gel foi incubado durante 16 horas a 37°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 2,5 mM. Posteriormente, foi rapidamente lavado com água e corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma®, St. Louis, EUA), conforme protocolo sugerido por Sambrook et al. (2001).

Também foi feito um ensaio de zimograma na presença dos inibidores PMSF e EDTA. O ensaio foi conduzido conforme descrito acima, porém, após a corrida, os géis foram tratados

desde o passo de lavagem com soluções contendo os inibidores (2,0 mM de cada). Estes foram avaliados separadamente e em conjunto.

4.7. Ensaio de atividade de L-aminoácido oxidase

A atividade de L-aminoácido oxidase da peçonha bruta foi avaliada por um método colorimétrico adaptado de Costa Torres et al. (2010). As reações foram conduzidas em duplicata em uma placa de ELISA de fundo plano. Diferentes concentrações de peçonha (3,3; 5,0; 6,6 e 8,3 µg/mL) foram incubadas em 150 µl de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,4 contendo L-leucina 2,0 mM (Synth®, São Paulo, Brasil), o-fenilenodiamina (SigmaFast OPD, Sigma®, St. Louis, EUA) diluído conforme indicação do fabricante e HRP 0,8 U/mL. A placa foi incubada durante 1 hora a 37°C, protegida da luz, e a reação foi interrompida com 75 µl de H₂SO₄ 2 M (Rioquímica, São Paulo, Brasil). A leitura foi feita em leitor de placas ajustado para 490 nm. Como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, H₂O₂ (Teclab, São Paulo, Brasil) diluído 1:30000 em tampão. Como branco, foi usado água.

4.8. Produção de fagos-anticorpos

4.8.1. Seleção de fagos-anticorpos

Foi utilizada uma biblioteca genômica de bacteriófagos que codificam scFv de imunoglobulina humana. A biblioteca, denominada *Griffin. 1*, foi produzida pela Dra. Heather M. Griffin do MRC de Cambridge (*Medical Research Council, Laboratory of Protein Engineering*, Cambridge, Reino Unido, dados não publicados) a partir da clonagem das regiões variáveis das cadeias leve (V_L) e pesada (V_H) de vetores da biblioteca lox no fagomídeo pHEN2. Esse fagomídeo é capaz de produzir fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv em fusão com a proteína pIII do bacteriófago M13. Para a seleção de fagos-anticorpos específicos para a peçonha de *Lachesis*, foi utilizado o método de *bio-panning*, conforme descrito por Kulkeaw (2009), modificado. Esse método é baseado na ligação do antígeno a uma fase sólida, seguido de seleção, lavagem e eluição dos fagos relevantes.

O primeiro turno de seleção foi conduzido em imunotubos de poliestireno (Nunc®, Kamstrup, Dinamarca, 5 mL), visto que a biblioteca estava aliquoteada em frações de 1 mL. O imunotubo foi preenchido com 4 mL de MPBS 1% (leite em pó desnatado 1% (p/v) (Molico, Nestlé Brasil Ltda®, São Paulo) diluído em PBS pH 7,2) e incubado por 16 horas a 4°C, sem agitação. Após 3 lavagens com PBS pH 7,2, o imunotubo foi tratado com 1,0 mL de solução de glutaraldeído (15 µl de glutaraldeído (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) diluído em 2 mL de PBS pH 8,0) e incubado por 15 minutos em agitador (Titer Plate Shaker, Lab-Line Instruments Inc, Melrose Park, EUA) e mais 15 minutos em repouso, à temperatura ambiente. O imunotubo foi lavado 3 vezes com PBS pH 7,2, sensibilizado com 1 mL de peçonha 200 µg/mL em PBS pH 7,2 e incubado conforme o passo anterior. O imunotubo foi novamente lavado 3 vezes com PBS e bloqueado por 2 horas a 37°C com 4 mL de MPBS 1%. Após outras 3 lavagens, a biblioteca de fagos (1 mL – 10^{12} fagos), diluída em 3 mL de MPBS 1%, foi adicionada e o imunotubo foi incubado por 30 minutos a 4°C e mais 90 minutos a 37°C, com agitação suave a cada 15 minutos. Para a remoção de fagos inespecíficos, o imunotubo foi lavado 10 vezes com PBST (PBS pH 7,2 acrescido de Tween 20 (Across Orgânicos, Thermo Fisher Scientific, EUA) 0,05% (v/v)) e 10 vezes com PBS. Os fagos que permaneceram ligados foram, então, eluídos. Foram adicionados 2 mL de trietilamina (Sigma®, St. Louis, EUA) 100 mM e, após 10 minutos de incubação vertical 20% (Glas-Col®, Terre Haute, EUA) à temperatura ambiente, o conteúdo foi transferido para outro tubo contendo 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 para neutralizar o pH. Para garantir a recuperação do maior número de fagos, foi feita uma eluição semelhante com glicina-HCl 100 mM pH 2,2.

Para evitar gasto excessivo de peçonha, os demais turnos foram conduzidos em placa de ELISA, sendo que o volume de peçonha foi reduzido para 100 µl. Os demais passos foram semelhantes, com redução proporcional nos volumes. Visando à obtenção de fagos mais específicos, o número de lavagens foi aumentado. No segundo turno, foram feitas 15 lavagens com PBST e 15 com PBS. Para o terceiro e quarto turnos, foram feitas 20 lavagens.

4.8.2. Amplificação de fagos-anticorpos

Os fagos-anticorpos foram amplificados através da infecção de uma cultura de bactérias *Escherichia coli* TG1, linhagem supressora [k12, D9lac-pro), supE, thi, hsdD/F' traD36, proA+B+, lacIq, lacZDMIS].

Uma cultura de bactérias TG1 foi cultivada em 5 mL de meio LB a 37°C e 300 rpm (Shaker Lab Line, 4628) por 8 horas, até saturação. Uma alíquota de 500 µL foi usada para infectar 50 mL de meio LB e a nova cultura foi incubada até atingir a fase de crescimento exponencial ($D.O_{600}$ 0,4-0,6). Os fagos eluídos obtidos no passo anterior (item 4.8.1) foram utilizados para infectar 10 mL dessa cultura. No primeiro turno, foram utilizados 1,5 mL de cada eluato (trietilamina e glicina) e, nos demais turnos, 200 µL de cada. As culturas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, sem agitação, para permitir a infecção. Uma alíquota de 50 µL foi retirada para o preparo de diluições seriadas (1:10 e 1:100), as quais foram semeadas em placas de Petri descartáveis pequenas (Corning Incorporated, NY, EUA) contendo LB agar (Invitrogen, EUA) suplementado com ampicilina (Ariston, São Paulo, Brasil) 100 µg/mL e glicose (Sigma®, St Louis, EUA) 1% (p/v). Foi feita uma placa controle com bactérias não infectadas. As placas foram incubadas em estufa (Mettler, UE300, Büchenbach) a 37°C e o restante da cultura foi centrifugado por 30 minutos a 3300 xg (centrífuga IEC, OM2438, EUA). O precipitado foi ressuspensionado em LB e semeado em placa quadrada de 500 cm² (Nunc bio-Assay dish, Gibco-BRL) contendo LB agar suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 1% (p/v). Esta foi incubada em estufa a 30°C. Após 14 horas, o título de bactérias infectadas foi estimado através da contagem de colônias isoladas nas placas pequenas. À placa quadrada foi adicionada uma solução de glicerol 30% (v/v) em LB e as colônias foram raspadas com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão de células obtida foi alíquotada e armazenada em freezer a -80°C (SANYO Ultra-Low, MDF-U3086S, UK).

4.8.3. Recuperação dos fagos-anticorpos

Os fagos-anticorpos foram expandidos em bactérias TG1 após infecção com o fago auxiliar VCS-M13.

Uma alíquota de 25 µL da suspensão de bactérias infectadas, obtida no passo de amplificação, foi cultivada em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 1% (p/v) até atingir a fase de crescimento exponencial. Tomou-se cuidado para que a $D.O_{600}$ inicial não fosse maior que 0,1. A cultura foi, então, infectada com o fago auxiliar VCS-M13 (1×10^{12} fagos/mL) na proporção 1:20 (bactéria:fago auxiliar), levando-se em conta que uma unidade de $D.O_{600}$ de bactéria corresponde a cerca de 8×10^8 bactérias/mL. Após incubação por 45 minutos a 37°C, a cultura foi centrifugada a 3300 xg por 30 minutos, o

precipitado foi ressuspendido em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e canamicina (Sigma®, St Louis, EUA) 25 µg/mL e incubado por 14 horas a 30°C e 200 rpm. A cultura foi centrifugada novamente, para remoção das células, e o sobrenadante separado. Os fagos em solução foram recuperados por precipitação com solução de PEG/NaCl (Polietilenoglicol 6000 (Across Orgânicos, Thermo Fisher Scientific, EUA) 20% (p/v); NaCl 2,5 M) na proporção 1:5 (PEG/NaCl:sobrenadante) (v/v). A mistura foi incubada por 2 horas em banho de gelo e centrifugada por 1 hora a 0°C e 3300 xg. O precipitado foi ressuspendido em 1,75 mL de PBS pH 7,2, centrifugado rapidamente em microcentrífuga para a remoção de restos celulares, aliqotado e armazenado a -20°C.

4.8.4.ELISA de fagos-anticorpos policlonais

Os fagos-anticorpos obtidos após cada turno de seleção foram avaliados quanto a sua especificidade contra a peçonha bruta por um ensaio imunoenzimático de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Poços de uma placa de ELISA de fundo plano foram sensibilizados com 50 µL de peçonha (2,5 µg/poço) diluída em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) 50 mM pH 9,6. A placa foi incubada por 16 horas a 4°C e bloqueada por 2 horas a 37°C com 250 µL de solução BSA 5 mg/mL preparada em PBS pH 7,2. Os fagos precipitados referentes a cada turno de seleção foram misturados com solução de BSA (75 µL de fagos:25 µL de BSA) e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a placa ser lavada 3 vezes com PBS pH 7,2 e 3 com PBST, os fagos precipitados foram adicionados e a placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme o passo anterior, foram adicionados 75 µL de anticorpo de coelho-anti-M13 conjugado com peroxidase diluído 1:50 em solução de BSA e a placa foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e foram adicionados 100 µL de substrato (1 mL de TMB (Sigma®, St. Louis, EUA) e 5 µL de H₂O₂ diluídos em 9,0 mL de tampão citrato-fosfato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) 100 mM pH 5,0). A placa foi incubada por 20 minutos (ou até o aparecimento de cor) a 37°C, protegida da luz, e a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2M. A leitura foi feita em leitor de placas em comprimento de onda de 450 nm. Como controle positivo, poços foram sensibilizados com VCS-M13 (u.f.p. 10⁹) e, como controle negativo, com tampão carbonato-bicarbonato em vez

de peçonha. Também foi feito um controle com poços sensibilizados com BSA com o objetivo de verificar se os fagos se ligariam a outras proteínas além da peçonha. Ainda, para confirmar a eficiência da produção e precipitação dos fagos-anticorpos, foram feitos controles sensibilizando-se a placa com os próprios fagos precipitados (25 µL/poço).

4.8.5. Produção de fagos-anticorpos monoclonais

O 4º turno de seleção foi escolhido para a produção de fagos-anticorpos monoclonais. Uma alíquota de 10 µL de fagos precipitados foi utilizada para infectar 10 mL de TG1 em fase de crescimento exponencial. A cultura foi incubada por 45 minutos a 37°C, sem agitação, e 20 µL foram utilizados para preparar diluições seriadas (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} e 10^{-11}), as quais foram semeadas em placas de Petri descartáveis contendo LB agar suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 1% (p/v). Também foi feita uma placa controle com bactérias não infectadas. As placas foram incubadas por 14 horas a 37°C e colônias isoladas foram repicadas para duas placas de cultura de 96 poços (Costar®, Corning Incorporated, NY, EUA, fundo oval) contendo meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 1% (p/v) (150 µL/poço). Quatro poços em cada placa (2B, 4G, 8B e 10G) não foram infectados para serem usados como controles nos experimentos subsequentes. As placas foram incubadas por 8 horas a 37°C e 200 rpm (Shaker Lab Line, 4628) para garantir o crescimento bacteriano. A cada poço foi adicionada solução de glicerol (50 µL) diluído em meio LB para uma concentração final de 30% e as placas foram armazenadas a -80°C. Essas placas foram chamadas de primárias 1 e 2.

4.8.6. ELISA de fagos-anticorpos monoclonais

Alíquotas de 6,5 µL de cada clone da placa primária 1 foram retiradas e usadas para infectar uma nova placa de cultura contendo meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 1% (p/v) (200 µL/poço). Essa placa, chamada de secundária 1, foi incubada a 37°C e 200 rpm até que os clones estivessem em fase de crescimento exponencial. Eles foram, então, infectados com o fago auxiliar VCS-M13 e incubados por 30 minutos a 37°C e repouso. A placa foi centrifugada por 30 minutos a 3300 xg (centrífuga IEC adaptada com rotor de placas, OM2438, EUA) e os precipitados foram ressuspensos em 250 µL de meio

LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e canamicina 25 µg/mL. Após 14 horas de incubação a 30°C e 200 rpm, a placa secundária foi centrifugada novamente e cada sobrenadante de cultura contendo fagos-anticorpos monoclonais foi utilizado em um ELISA monoclonal seguindo-se protocolo semelhante àquele descrito no item 4.8.4. Os poços 2B, 4G, 8B e 10G não foram infectados (continham apenas meio de cultura) e foram usados como controle negativo.

Doze clones (1B, 1C, 1E, 2A, 2C, 2F, 2G, 3B, 3E, 4E, 4H e 9F) foram escolhidos para a produção de fagos-anticorpos monoclonais precipitados, conforme protocolo descrito no item 4.8.3. A especificidade dos fagos-anticorpos monoclonais precipitados para a peçonha bruta foi avaliada por ELISA seguindo-se protocolo semelhante àquele descrito no item 4.8.4

4.9. Produção de fragmentos de anticorpos humanos solúveis

4.9.1. Infecção de *E. coli* HB2151

Alguns dos fagos-anticorpos monoclonais capazes de reconhecer a peçonha bruta de *Lachesis* no ensaio de ELISA foram utilizados para a produção de fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv mediante infecção de bactérias *E. coli* HB2151, linhagem não supressora [k12, ara, D(lac-pro), thi/F'proA+B, lacIqZDM15]. Essa linhagem lê um códon de terminação no gene viral (infectado na bactéria) e interrompe a transcrição antes da sequência da proteína pIII do capsídio viral. O scFv traduzido possui uma sequência sinal responsável por endereçá-lo para o espaço periplasmático, de onde pode ser purificado.

Os fagos-anticorpos monoclonais de interesse (placa primária 1: 1E, 2B, 2C, 2F, 3B, 3E, 4E, 4H e 9F) foram amplificados e precipitados conforme protocolos descritos anteriormente. Uma cultura de bactérias HB2151 foi cultivada a 37°C e 300 rpm até atingir a fase de crescimento exponencial e alíquotas de 5 mL foram infectadas com 50 µL de cada fago-anticorpo monoclonal precipitado. As culturas foram incubadas em repouso por 30 minutos a 37°C e centrifugadas por 30 minutos a 3300 xg. As bactérias foram ressuspensas e semeadas em placas de Petri descartáveis contendo meio LB agar suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 1% (p/v). Após incubação por 14 horas a 37°C, foi adicionada uma solução de glicerol 30% (v/v) em LB e as colônias foram raspadas com auxílio de uma alça de Drigalski. As suspensões foram alíquotadas e armazenadas a -80°C. Alíquotas foram

utilizadas para infectar novos meios de cultura contendo 5 mL de LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 0,1% (p/v). Após incubação por 14 horas a 37°C e 300 rpm, as culturas foram transferidas para Erlenmeyers descartáveis de 1 L (Corning®, NY, EUA) contendo 250 mL de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL e glicose 0,1% (p/v). As culturas foram incubadas a 37°C e 300 rpm até atingirem D.O.₆₀₀ 0,6. Foi adicionado IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactosídeo) para uma concentração final de 1 mM e as culturas foram incubadas por mais 5 horas a 30°C. Os meios de cultura foram centrifugados por 20 minutos a 4000 xg, 2°C (Sorvall Legend RT+ Centrifuge, Thermo, Asheville, EUA) e cada precipitado foi pesado e ressuspenso em tampão Tris-HCl 30 mM pH 8,0 contendo sacarose 20% (p/v) (80 mL de tampão por grama de precipitado). Foi adicionada solução de EDTA 500 mM, vagarosamente, até concentração final de 1 mM, as culturas foram mantidas em banho de gelo por 10 minutos, sob agitação suave, e foram centrifugadas a 8000 xg (Sorvall Legend RT+ Centrifuge, Thermo, Asheville, EUA) por 20 minutos a 2°C. Os precipitados foram ressuspenso no mesmo volume de solução de MgSO₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha) 5 mM e mantidos por mais 10 minutos em banho de gelo e agitação suave. As células foram removidas por centrifugação (8000 xg, 20 minutos, 2°C) e o sobrenadante de cultura de cada clone contendo o extrato de periplasma foi submetido à purificação.

4.9.2. Purificação dos fragmentos de anticorpos

Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv produzidos pela biblioteca *Griffin. 1* são fusionados a peptídeos de marcação que facilitam a detecção e a purificação. Trata-se de uma cauda de hexa-histidina, que exibe forte interação por matrizes de íons metálicos, e um c-myc, que se liga ao anticorpo monoclonal 9E10. Optou-se por utilizar um protocolo adaptado do guia The QIAexpressionist (QIAexpressionist, 2003) e uma resina de agarose ligada a níquel, Ni-NTA (QIAgen, Alemanha) para a purificação dos fragmentos de anticorpo a partir dos extratos de periplasma. Inicialmente, foi feito um teste com o clone 9F. Adicionou-se sais ao extrato de periplasma até concentrações finais de NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha) 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) 10 mM. O pH foi ajustado para 8,0 e o extrato incubado com a resina (4 mL) durante 14 horas a 4°C e agitação vertical 20%. Uma coluna (14 x 1,5 cm, altura x diâmetro) foi empacotada com a mistura e lavada com 8 mL de tampão NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0 acrescido

de NaCl 300 mM e imidazol 10 mM. A eluição foi feita de 2,4 em 2,4 mL com tampões com concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 100, 200, 300 e 500 mM) e a coleta feita de 800 em 800 μ L. Alíquotas dos efluentes, lavagens e eluições foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

Para as purificações subseqüentes, a resina foi previamente lavada e reativada conforme descrito no guia The QIAexpressionist (QIAexpressionist, 2003). As eluições foram feitas com 10, 100, 300 e 500 mM de imidazol e os demais passos foram mantidos. As frações que apresentaram maior pureza foram misturadas e dialisadas durante 36 horas, em água deionizada, com trocas a cada 12 horas. Cada clone foi liofilizado (Liofilizador L101, Liobras, São Paulo, Brasil) por 48 horas, ressuscitado em 1,5 mL de água deionizada e a concentração de proteínas foi determinada. A pureza de cada um foi avaliada por SDS-PAGE 12% corado por prata.

4.10. Ensaios de inibição das atividades tóxicas da peçonha

4.10.1. Inibição da atividade hemolítica

A inibição da atividade hemolítica da peçonha bruta pelos fragmentos de anticorpo scFvs purificados foi avaliada em um ensaio cinético conduzido em placa de ELISA, semelhante ao ensaio descrito no item 4.5.1. Os fragmentos de anticorpos foram pré-incubados com 1,25 μ g da peçonha (concentração no meio de reação, 5,0 μ g/mL), nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) durante 2 horas a 4°C. A solução de hemólise foi adicionada e a placa foi incubada por 2 horas a 37°C, sem agitação. Leituras foram feitas em intervalos de 5, 10 ou 15 minutos. Como controle negativo, utilizou-se solução salina em vez de peçonha e, como controle positivo, utilizou-se peçonha na ausência de scFvs. Também foi feito um controle com scFv sem peçonha para verificar se fragmentos de anticorpos poderiam ser responsáveis pela hemólise.

4.10.2. Inibição da atividade proteolítica

A inibição da atividade proteolítica da peçonha bruta pelos fragmentos de anticorpo foi avaliada em um ensaio de protease de ponto final semelhante àquele descrito no item

4.6. Os fragmentos de anticorpo foram pré-incubados com 5,0 µg de peçonha (concentração no meio de reação de 10 µg/mL), em solução tamponada, nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) durante 2 horas a 4°C. O substrato (caseína desnaturada) foi adicionado e as amostras foram incubadas por 3 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 500 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, os peptídeos em solução no sobrenadante foram avaliados por leitura em espectrofotômetro ajustado para 280 nm. Como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de scFvs. Para cada clone, foi feito um controle com tempo 0 de reação. Nesse caso, adicionou-se TCA antes do substrato de modo a desnaturar os scFvs e a peçonha antes que o substrato fosse adicionado.

Também foram feitos ensaios de inibição da proteólise usando fagos monoclonais. Os ensaios foram preparados conforme descrito acima, porém, foi utilizado sobrenadante de cultura em vez de scFvs. Os fagos foram preparados a partir da placa primária 1, conforme descrito no item 4.8.6. Nesses ensaios, entretanto, não foi mantida uma proporção fago:peçonha. A peçonha (5,0 µg/mL) foi pré-incubada com 50 µL de fagos monoclonais, em solução tamponada, por 2 horas a 4°C. Para cada clone foi feito um controle com tempo 0 de reação. Como foi utilizado meio de cultura centrifugado como fonte de fagos, esse controle é importante, visto que muitas proteínas e contaminantes estão presentes e não necessariamente precipitam com TCA, o que poderia gerar erros no resultado final. Os poços 2B e 4G correspondem a controles negativos, nos quais não foi adicionada peçonha e os poços 8B e 10G correspondem a controles positivos, nos quais foi adicionado meio de cultura em vez de sobrenadante de cultura contendo fagos-anticorpos.

Os clones 1B, 1C e 2A foram selecionados para a produção de fagos-anticorpos precipitados (protocolo descrito no item 4.8.3), os quais foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição da atividade proteolítica da peçonha conforme descrito acima.

4.10.3. Inibição da atividade de L-aminoácido oxidase

A inibição da atividade de L-aminoácido oxidase da peçonha bruta pelos fragmentos de anticorpo purificados foi avaliada em um ensaio de ponto final conduzido em placa de ELISA, em ensaio semelhante àquele descrito no item 4.7. Os scFvs foram pré-incubados com 1,25

µg de peçonha (concentração no meio de reação de 8,3 µg/mL) nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) durante 2 horas a 4°C. A solução de substrato foi adicionada e as amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida com H₂SO₄ e a leitura foi feita em leitor de placas em comprimento de onda de 490 nm. Como controle negativo, foi utilizado tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de scFvs. Também foi feito um teste com scFv na ausência de peçonha para verificar se os fragmentos de anticorpos poderiam estar contribuindo para o aumento da absorvância.

Também foram feitos ensaios de inibição da deaminação oxidativa de L-leucina usando fagos-anticorpos monoclonais. Os ensaios foram preparados conforme descrito acima, porém, foi utilizado sobrenadante de cultura em vez de scFv. Os fagos foram preparados a partir da placa primária 1, conforme descrito no item 4.8.6. A peçonha (0,75 µg, concentração no meio de reação 5,0 µg/mL) foi pré-incubada com 40 µL de fagos monoclonais, entretanto, não foi mantida uma proporção fago:peçonha. Os poços 4G e 8B correspondem a controles negativos, nos quais não foi adicionada peçonha e os poços 2B e 10G correspondem a controles positivos, nos quais foi adicionado meio de cultura em vez de sobrenadante de cultura contendo fagos-anticorpos.

5. Resultados

5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Amostras da peçonha foram submetidas a um ensaio de SDS-PAGE 12% na presença e ausência de agentes redutores. O perfil eletroforético está representado na figura 5.

Figura 5. Análise da peçonha por SDS-PAGE. Amostras de 1,5 µg (A, E) e 3,0 µg (B, D) de peçonha foram preparadas na presença (D, E) e ausência (A, B) de agentes redutores (β -mercaptoetanol) e submetidas a uma corrida em gel de poliacrilamida 12% sob diferença de potencial de 90 V. O gel foi corado por prata e as amostras comparadas com um padrão de peso molecular (C). Setas indicam a massa (kDa) de algumas bandas do padrão.

5.2. Ensaios de atividade fosfolipásica

5.2.1. Ensaio cinético de hemólise indireta

O primeiro ensaio usado com a intenção de avaliar a atividade tóxica da peçonha foi um ensaio cinético de hemólise indireta capaz de avaliar a atividade de fosfolipase A2. Trata-se de um método turbidimétrico em que, quanto maior a absorvância, maior o número de células intactas e, conseqüentemente, menor a taxa de hemólise. Foi avaliada a capacidade de diferentes concentrações de peçonha em promover hemólise evidente, conforme pode ser visto na figura 6. Houve uma queda de absorvância acentuada para as concentrações 25,0 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e as leituras chegaram próximas de 0 com cerca 15 e 20 minutos, respectivamente. Para as demais concentrações, houve queda, porém, menos acentuada. O controle negativo manteve-se estável durante o experimento. Para os demais ensaios cinéticos de atividade fosfolipásica, optou-se por utilizar concentração de peçonha de 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 6. Ensaio cinético de hemólise indireta. Diferentes concentrações de peçonha (3,12; 6,25; 12,5 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a 175 μl de solução de hemólise para um volume final de 200 μl . A placa foi incubada a 37°C sem agitação e leituras em comprimento de onda de 700 nm foram realizadas em intervalos de 5 ou 10 minutos. As amostras foram comparadas com uma reação 100% hemolisada (branco) e, como controle negativo, foi utilizada solução salina em vez de peçonha.

5.2.2. Ensaio de hemólise indireta de ponto final

Além do ensaio cinético, foi feito um ensaio de hemólise indireta de ponto final. Após incubação de diferentes concentrações de peçonha com a solução de hemólise, restos celulares foram removidos por centrifugação e a hemoglobina em solução foi avaliada espectrofotometricamente. Diferentemente do ensaio anterior, em que foi avaliada a concentração de células no meio, neste foi avaliada a concentração de hemoglobina liberada após a lise dos eritrócitos. Como pode ser observado na figura 7, a concentração mais baixa (0,5 µg/mL) já foi suficiente para promover hemólise aparente. A leitura estabilizou-se a partir de 1,0 µg/mL, ou seja, todas as hemácias estavam sofrendo lise com concentrações de peçonha iguais ou acima desse valor.

Figura 7. Ensaio de hemólise indireta de ponto final. Diferentes concentrações de peçonha bruta (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL) foram incubadas com solução de hemólise por 1 hora a 37°C, sem agitação. Restos celulares foram removidos por centrifugação (10 minutos a 11600 xg) e a hemoglobina em solução foi avaliada em espectrofotômetro ajustado para 412 nm. Como controle negativo (também usado como branco), utilizou-se solução salina em vez de peçonha. Os valores foram comparados entre si por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística.

5.2.3. Zimograma para atividade de PLA₂

A presença de PLA₂ na peçonha foi confirmada através de um zimograma e sua massa molecular pôde ser estimada por comparação com o padrão de peso molecular. Duas amostras de peçonha de concentrações diferentes foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de SDS e ausência de agentes redutores. O gel foi tratado para a remoção do SDS e incubado sobre um gel de agarose 1% contendo gema de ovo 2,5%. Foi, então, possível observar o aparecimento de bandas claras no gel de agarose, correspondentes a fosfolipases A₂ (Figura 8). Conforme pode ser observado, a peçonha apresenta apenas uma PLA₂, ou isoformas com massas moleculares próximas, por volta de 17 kDa.

Figura 8. Zimograma para atividade de fosfolipase A₂. A, gel de poliacrilamida 12% corado por prata; B, gel de agarose 1% contendo gema de ovo 2,5%. Após eletroforese da peçonha (B1, 1,25 µg e B2, 2,5 µg) em gel de poliacrilamida 12% sob condições não redutoras, o gel foi lavado para remoção do SDS e incubado sobre um gel de agarose contendo gema de ovo como substrato. Bandas claras indicam atividade de PLA₂. A canaleta A1 corresponde ao padrão de peso molecular.

5.3. Ensaio de atividade proteolítica

5.3.1. Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha

A atividade de protease da peçonha foi inicialmente avaliada em um ensaio baseado na hidrólise de BSA. Três diferentes concentrações de peçonha foram avaliadas. Como pode ser observado na figura 9, há uma relação proporcional entre a concentração de peçonha e a atividade proteolítica, estimada de acordo com a concentração de peptídeos em solução. Entretanto, mesmo para concentrações mais elevadas de peçonha e 3 horas de incubação, a atividade foi relativamente baixa, apresentando valores de absorvância inferiores a 0,1. Também pode ser observado que a peçonha por si só não gera aumento considerável na absorvância (cerca de 0,010).

Figura 9. Ensaio de atividade proteolítica variando-se a concentração de peçonha. Três diferentes concentrações de peçonha (25,0; 62,5 e 125 µg/mL) foram incubadas a 37°C por 3 horas em 500 µL de meio de reação contendo BSA 5 mg/mL como substrato e a reação foi interrompida com 500 µL de TCA 10%. Após centrifugação, os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280nm. Como controle negativo, foi usado tampão em vez de peçonha (também usado como branco). Também foi feito um controle com a peçonha (62,5 µg/mL) desnaturada antes da adição do substrato. Os valores foram comparados com o controle pelo teste t ($p < 0,05$).

5.3.2. Ensaio de proteólise variando-se o modo de preparo do substrato

Na tentativa de evitar gasto excessivo de peçonha, foi feito um ensaio com o substrato não desnaturado e previamente desnaturado em meio alcalino para se tentar obter valores de leitura mais altos. Optou-se por utilizar peçonha na concentração 50 µg/mL. Como pode ser observado, houve um aumento significativo na atividade proteolítica quando utilizado substrato previamente desnaturado (Figura 10).

Figura 10. Ensaio de atividade proteolítica com substrato não desnaturado e desnaturado. A peçonha (50 µg/mL) foi incubada em 500 µL de meio de reação contendo BSA ou BSA previamente desnaturado por 3 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 500 µL de TCA 10% e os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280nm. Para cada substrato foi feito um controle negativo com tampão em vez de peçonha e, como branco, utilizou-se água. Os valores foram comparados entre si e com os respectivos controles por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.3.3. Ensaio de proteólise variando-se a temperatura

Foram feitos ensaios a 30 e 40°C para verificar se essas temperaturas, diferentes da fisiológica (37°C), acarretariam em alterações nos valores de absorvância. Como era de se esperar, a atividade enzimática aumentou à medida que a temperatura de incubação foi elevada (Figura 11). No entanto, seriam necessários ensaios com outras temperaturas para se determinar a temperatura ótima e o ponto a partir do qual há uma queda de atividade. A diferença percebida quando a temperatura passou de 37°C para 40°C, apesar de significativa, não foi alta o suficiente para justificar uma alteração no protocolo, visto que a idéia principal é mimetizar as condições fisiológicas. Optou-se, então, por manter a temperatura de 37°C nos ensaios subseqüentes.

Figura 11. Ensaio de atividade proteolítica variando-se a temperatura. A peçonha (50 µg/mL) foi incubada em 500 µL de meio de reação contendo BSA previamente desnaturado por 3 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 500 µL de TCA 10% e, após centrifugação, os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280nm. Como controle, foi utilizado tampão em vez de peçonha e, como branco, foi usado água. Os valores foram comparados com o controle por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.3.4. Ensaio de proteólise variando-se o substrato

Visando a diminuir ainda mais a quantidade de peçonha necessária para o ensaio de proteólise, foram testados os seguintes substratos: BSA desnaturado, caseína desnaturada e bactogelatina. Não foi possível estimar a atividade de protease com bactogelatina, visto que o substrato não precipitou após a adição de TCA. Apesar de a quantidade de peçonha nesse experimento ter sido reduzida e parecer que há pouca diferença entre controle negativo e peçonha no ensaio com BSA, deve-se observar que a escala foi reduzida. Para o ensaio com caseína, apesar de o controle sem peçonha ter apresentado leitura mais alta (aproximadamente 0,2), o teste com peçonha apresentou leitura significativamente mais elevada (diferença de aproximadamente 0,7) (Figura 12). Optou-se, então, por utilizar caseína desnaturada nos demais ensaios de protease.

Figura 12. Ensaio de atividade proteolítica variando-se o substrato. A peçonha (20 µg/mL) foi incubada em 500 µL de meio de reação contendo BSA ou caseína previamente desnaturados por 3 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 500 µL de TCA 10% e os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280nm. Para cada substrato foi preparado um controle negativo com tampão em vez de peçonha e, como branco, foi usado água. Os valores foram comparados entre si e com os respectivos controles por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.3.5. Ensaio de proteólise variando-se a concentração de peçonha

Como a utilização de caseína desnaturada como substrato resultou em atividade de protease mais acentuada, ela foi escolhida para ser usada nos demais ensaios proteolíticos. Entretanto, foi necessário padronizar novamente as concentrações de peçonha capazes de promover atividade de protease evidente. Quatro diferentes concentrações foram avaliadas. Mesmo a concentração mais baixa (5,0 $\mu\text{g/mL}$) resultou em atividade de protease significativa, se comparada com o controle negativo. Como era de se esperar, maiores concentrações resultaram em atividades mais altas, porém, a quantidade de peçonha gasta também é elevada (Figura 13). Optou-se, então, nos ensaios subsequentes, por utilizar peçonha na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 13. Ensaio de atividade proteolítica variando-se a concentração de peçonha. Amostras de peçonha em diferentes concentrações (5,0; 10; 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$) foram incubadas em 500 μL de meio de reação contendo caseína previamente desnaturada por 3 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 500 μL de TCA 10% e, após centrifugação, os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280nm. Como controle, foi utilizado tampão em vez de peçonha e, como branco, água. Os valores foram comparados com o controle por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.3.6. Ensaio de inibição da proteólise com PMSF e EDTA

Com o intuito de verificar os tipos de proteases presentes na peçonha bruta, dois inibidores, em diferentes concentrações, foram incubados no meio de reação. Foram eles: PMSF, inibidor de serinoproteases e EDTA, inibidor de metaloproteases. Para cada concentração de inibidor foi feito um controle com tempo 0 de incubação para avaliar se o tipo de inibidor e a concentração poderiam gerar alterações na absorvância. Como não houve diferença entre as leituras, os resultados não foram plotados no gráfico. Também foi feito um controle negativo com tampão em vez de peçonha. Não houve diferença estatística entre os valores observados para PMSF e EDTA quando presentes na concentração de 1 mM. Entretanto, houve diferença para as demais concentrações e, conforme pode ser observado na figura 14, o efeito de EDTA sobre a atividade de protease foi mais acentuado do que o efeito de PMSF. Nenhum dos inibidores foi capaz de inibir totalmente a atividade proteolítica. Entretanto, apesar de haver diferença estatística entre o controle e o ensaio com ambos os inibidores nas concentrações de 2 e 4 mM, estes inibiram mais do que os dois inibidores separadamente.

Figura 14. Ensaio de inibição da proteólise com PMSF e EDTA. A peçonha (15 µg/mL) foi incubada em 500 µL de meio de reação contendo PMSF, EDTA ou ambos em diferentes concentrações por 3 horas a 37°C. A reação foi interrompida com 500 µL de TCA 10% e os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280nm. Como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de inibidores. Como branco, utilizou-se água. Os valores foram comparados entre si por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística. Os ensaios foram realizados em duplicata.

5.3.7. Zimograma para atividade de protease

A presença de proteases na peçonha foi confirmada através de um zimograma e seus pesos moleculares foram estimados por comparação com um padrão de peso molecular. Removidos os traços de SDS com as lavagens, o gel foi incubado e as proteases presentes atuaram sobre a caseína dissolvida, degradando-a. Como o gel foi preparado com caseína, todo ele ficou azulado após coloração com coomassie, exceto aqueles pontos onde houve proteólise. Como pode ser observado na figura 15, a peçonha aparenta ter 3 proteases diferentes, uma com cerca de 40 kDa, outra com cerca de 35 kDa e outra com cerca de 24 kDa (indicadas por setas largas).

Figura 15. Zimograma para atividade de protease. Gel de poliacrilamida 12% contendo caseína 0,07% submetido a uma diferença de potencial de 60V a 4°C. Após corrida e lavagem para remoção do SDS, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM e CaCl₂ 2.5 mM por 16 horas a 37°C e corado com *coomassie blue*. Bandas claras indicam atividade proteolítica. A, peçonha 10 µg; B, peçonha 40 µg; C, padrão de peso molecular; D, peçonha 100 µg.

Visando à identificação dos tipos de proteases evidenciados no zimograma, foi feito um ensaio na presença de inibidores. A presença do inibidor de metaloproteases, EDTA, resultou em uma diminuição da atividade da protease de 24 kDa e não mostrou interferência na atividade das demais proteases (figura 16B). Diferentemente, a presença do inibidor de serinoproteases, PMSF, resultou em inibição das três proteases (figura 16D). Também foi feito um ensaio em que o gel foi incubado na presença de ambos os inibidores e, conforme pode ser observado na figura 16C, nenhuma protease demonstrou atividade sob essa condição. Os resultados indicam que as três proteases observadas no gel são do tipo serinoproteases.

Figura 16. Zimograma para atividade de protease na presença de PMSF e EDTA. Após corrida, os géis foram tratados desde a lavagem com soluções contendo PMSF (D), EDTA (B), ambos (C) ou nenhum (A). Os géis foram incubados por 16 horas a 37°C e corados com *coomassie blue*. Bandas claras indicam atividade proteolítica. a, peçonha 20 µg; b, peçonha 40 µg e c, padrão de peso molecular.

5.4. Ensaio de L-aminoácido oxidase

A atividade de L-aminoácido oxidase da peçonha foi avaliada por um método indireto baseado na deaminação oxidativa do substrato (L-leucina) e conseqüente produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é reduzido pela peroxidase presente no meio usando OPD como substrato. O produto formado apresenta uma coloração alaranjada, a qual é transformada em amarela pela adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4), que também age desnaturando as enzimas e interrompendo a reação. A leitura é feita, então, em comprimento de onda de 490 nm. No ensaio, diferentes concentrações de peçonha foram utilizadas para verificar a atividade de L-aminoácido oxidase. Como pode ser observado na figura 17, há uma relação proporcional entre a concentração de peçonha e a atividade enzimática e, mesmo para a concentração mais baixa testada, a diferença de absorvância em relação ao controle negativo (tampão em vez de peçonha) foi significativa. Para os ensaios de inibição da atividade de L-aminoácido oxidase por fragmentos de anticorpo, optou-se por utilizar peçonha na concentração 8,3 $\mu\text{g/mL}$ e, para aqueles com sobrenadante de cultura (fagos-anticorpos monoclonais), optou-se por utilizar peçonha na concentração 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 17. Ensaio de L-aminoácido oxidase variando-se a concentração de peçonha. Amostras de peçonha em diferentes concentrações (3,3; 5,0; 6,67 e 8,33 $\mu\text{g/mL}$) foram incubadas a 37°C por uma hora em 150 μL de meio de reação contendo L-leucina, HRP e OPD. A reação foi interrompida com 75 μL de H_2SO_4 e as leituras foram feitas em leitor de placas ajustado para 490 nm. Como controle positivo, utilizou-se H_2O_2 diluído 1:30000 e, como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha. Como branco, utilizou-se água. Os valores foram comparados com o controle negativo por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.5. Produção de fagos-anticorpos

5.5.1. Título de fagos-anticorpos eluídos

Os fagos-anticorpos eluídos nos passos de seleção foram titulados após plaqueamento em meio seletivo contendo ampicilina. Como pode ser observado na figura 18, os títulos aumentaram com os turnos de seleção. Apenas um valor fugiu à regra (2º turno, trietilamina), e como a leitura foi muito alta, provavelmente isso ocorreu devido a algum erro experimental. Pode-se observar, ainda, que não houve crescimento para o eluato de Glicina-HCl do primeiro turno. Isso pode ser explicado porque muitos fagos já haviam sido eluídos com trietilamina e a diluição, mesmo de 1:10, pode ter sido muito grande. Para o quarto turno, não foi possível calcular o título, uma vez que o número de colônias foi incontável. O mais importante a ser observado é que existem fagos que permanecem ligados mesmo após eluição com trietilamina. Ou seja, foi interessante fazer uma eluição ácida para desligar aqueles fagos que permaneceram ligados mesmo após a eluição alcalina. Para todos os turnos, nenhuma colônia cresceu no controle negativo e as placas grandes apresentaram crescimento uniforme e contínuo, indicando que a seleção de fagos foi conduzida de forma satisfatória.

Figura 18. Título de fagos eluídos. Fagos eluídos com trietilamina ou glicina-HCl foram utilizados para infectar bactérias TG1 em fase de crescimento exponencial. Colônias isoladas foram contadas após as bactérias serem semeadas em meio seletivo (ampicilina) e o título foi calculado multiplicando-se esse valor pelo fator de diluição.

5.5.2. ELISA de fagos-anticorpos policlonais

Os fagos-anticorpos eluídos de cada turno de seleção foram amplificados em *E. coli* TG1 e recuperados por precipitação com polietilenoglicol/NaCl. Dessa forma, muitas proteínas contaminantes do meio de cultura foram eliminadas, tornando possível a utilização de fagos-anticorpos mais concentrados e um pouco mais puros. Para cada turno, foram feitos ensaios de especificidade contra a peçonha bruta e contra BSA, com o objetivo de verificar interações dos fagos com proteínas diferentes da peçonha. Não houve diferença estatística entre poços sensibilizados com peçonha ou BSA para o primeiro e o segundo turnos. O terceiro e o quarto turnos apresentaram valores significativamente mais altos de absorvância para a peçonha, indicando maior especificidade dos fagos (Figura 19). Como o quarto turno apresentou leituras mais elevadas, ele foi escolhido para a produção de fagos-anticorpos monoclonais.

Figura 19. ELISA de fagos-anticorpos policlonais. Fagos policlonais precipitados testados quanto a sua especificidade contra a peçonha (2,5 µg/poço) por ELISA. O bloqueio foi feito com solução BSA 5 mg/mL em PBS. Fagos específicos foram revelados com anticorpos anti-M13 conjugados com HRP e TMB/H₂O₂ em comprimento de onda de 450 nm. Como controle negativo, poços foram sensibilizados com tampão e, como controle positivo, com VCS-M13 (u.f.p. 10⁹). Para cada turno foi feito um controle com poços sensibilizados com 250 µg de BSA para verificar a especificidade dos fagos contra outras proteínas. Os valores foram comparados com os respectivos controles por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Também foi feito um controle com poços sensibilizados com os próprios fagos-anticorpos para verificar a eficiência do passo de recuperação e avaliar a quantidade total de fagos precipitados (específicos ou não para a peçonha). Não houve diferença significativa entre o primeiro e o segundo turnos nem entre o terceiro e o quarto. Entretanto, os valores de absorvância para o terceiro e quarto turnos foram significativamente superiores àqueles apresentados pelo primeiro e segundo (Figura 20).

Figura 20. ELISA de fagos-anticorpos policlonais. Poços foram sensibilizados com os próprios fagos-anticorpos (25 µL) de cada turno de seleção e bloqueados com solução de BSA 5 mg/mL em PBS. Como controle negativo, poços foram sensibilizados com tampão e, como controle positivo, com VCS-M13 (u.f.p. 10^9). Os valores foram comparados entre si por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística.

5.5.3.ELISA de fagos-anticorpos monoclonais

Colônias isoladas obtidas após infecção de bactérias TG1 com fagos-anticorpos policlonais precipitados do 4º turno de seleção foram cultivadas em placas de cultura e os sobrenadantes de cultura foram utilizados para verificar a especificidade de cada clone contra a peçonha bruta previamente sensibilizada em uma placa de ELISA (Figura 21). Os clones 1B, 1C, 1E, 2A, 2C, 2F, 2G, 3B, 3E, 4E, 4H e 9F foram selecionados para a produção de fagos-anticorpos monoclonais precipitados, que também foram avaliados quanto a sua especificidade contra a peçonha por ELISA. Conforme pode ser observado na figura 22, apenas o clone 1C não apresentou positividade contra a peçonha e os clones 1E, 2G, 4E e 9F demonstraram maior positividade.

Figura 21. Elisa de fagos-anticorpos monoclonais. Fagos anticorpos monoclonais obtidos a partir do sobrenadante de cultura da placa secundária 1 testados quanto a sua especificidade contra a peçonha bruta (2,5 µg/poço) por ELISA. Fagos específicos revelados com anticorpos anti-M13 conjugados com HRP e substrato TMB/H₂O₂. Poços 2B e 10G correspondem a controles negativos, em que foi adicionado meio de cultura em vez de sobrenadante contendo fagos. Poços 4G e 8B correspondem a controles positivos, sensibilizados com VCS-M13 (u.f.p. 10⁹). (A) poços 1A até 4H; (B) poços 5A até 8H; (C) poços 9A até 12H.

Figura 22. Elisa de fagos-anticorpos monoclonais precipitados. Clones que apresentaram resultados satisfatórios no ensaio de ELISA monoclonal foram selecionados para a produção de fagos-anticorpos monoclonais precipitados. Estes foram avaliados quanto a sua especificidade contra a peçonha (2,5 µg/poço) por ELISA. Para cada clone foi feito um controle com poços sensibilizados com BSA. Como controle negativo, poços foram sensibilizados com tampão e, como controle positivo, com VCS-M13 (u.f.p. 10^9). Ensaio em duplicata

5.5.4. Purificação dos fragmentos de anticorpos

O clone 9F foi selecionado para fazer um teste de eluição com tampões com concentrações crescentes de imidazol. Alíquotas do lavado e de cada eluato foram analisadas por SDS-PAGE. Como pode ser observado na figura 23, foram necessários 1,6 mL de tampão com imidazol 10 mM para que as proteínas contaminantes fossem lavadas (canaletas 10.1 e 10.2). A partir daí, o scFv começou a ser eluído e foi observado até a passagem do tampão de concentração 100 mM. O restante de scFv que permaneceu ligado à resina foi eluído com 300 mM de imidazol. Entretanto, proteínas contaminantes também foram eluídas. Por comparação com o lavado (*Flow*), supôs-se que tratava-se de proteínas que já estavam ligadas à resina antes da mesma ser incubada com o extrato de periplasma. Para confirmar essa hipótese, antes de a resina ser incubada com os demais clones, ela foi lavada seguindo-se protocolo sugerido no guia *The QIAexpressionist* (QIAexpressionist, 2003). As impurezas não foram observadas nas demais purificações.

Os demais clones foram eluídos com 10, 100, 300 e 500 mM de imidazol. As frações foram analisadas por SDS-PAGE (dados não mostrados) e aquelas mais puras foram

coletadas, dialisadas em água e liofilizadas. Os clones foram ressuspensos em água e a pureza de cada um foi novamente avaliada por SDS-PAGE (Figura 24). Como pode ser observado, com exceção do clone 2C, todas as purificações foram eficientes e o grau de pureza foi elevado. Por comparação com o marcador de peso molecular, estimou-se o peso dos fragmentos de anticorpos em 28 kDa. Para alguns clones, é possível visualizar algumas bandas mais fracas, sendo que uma delas (próximo a 60 kDa) provavelmente representa uma forma dimérica dos fragmentos de anticorpos.

Figura 23. Perfil eletroforético do clone 9F. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições não redutoras do lavado (*Flow*) e dos eluatos obtidos da purificação do clone 9F. As concentrações de imidazol dos tampões utilizados nas eluições estão indicadas acima de cada canaleta nos géis A (10 mM a 200 mM) e B (200 mM a 500 mM, além do lavado). Após eletroforese o gel foi corado com prata.

Figura 24. Perfil eletroforético dos clones purificados. Fragmentos de anticorpo correspondentes a cada clone foram purificados em resina de níquel, dialisados e liofilizados. Alíquotas das amostras concentradas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sob condições não redutoras, corado por prata. Os clones estão indicados acima de suas respectivas canaletas, sendo que a segunda (M.) representa o marcador de peso molecular.

5.6.1. Inibição da atividade hemolítica

Foi conduzido um ensaio cinético de hemólise para avaliar a capacidade de os fragmentos de anticorpos purificados inibirem a atividade de PLA₂ da peçonha. As moléculas de scFv foram pré-incubadas com a peçonha nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) e a capacidade de inibição foi avaliada após adição da solução de hemólise. O controle negativo apresentou uma queda suave ao longo do tempo enquanto o controle positivo estabilizou-se próximo de zero após cerca de 75 minutos. Para a proporção 1:1, o clone 4E inibiu a atividade durante 1 hora. A partir daí, houve uma queda e, ao final do ensaio, a leitura estava em cerca de 0,120, contra 0,010 do controle positivo. O clone 2C também mostrou capacidade inibitória relevante, apresentado leitura em cerca de 0,145 após 2 horas de incubação. Os clones 2F e 9F inibiram consideravelmente durante 1 hora, mas a partir daí a queda foi acentuada, estabilizando-se a leitura em cerca de 0,070 após 2 horas (Figura 25A).

Para a proporção 2:1 (scFv:peçonha), o clone 4E foi o que apresentou resultados mais satisfatórios, mantendo a leitura próxima à do controle negativo durante todo o experimento. Os clones 2F e 9F também são promissores inibidores da atividade de PLA₂. Foram capazes de inibir eficientemente a hemólise por cerca de 75 minutos e, ao final do experimento, apresentaram leituras de 0,140 e 0,150, respectivamente, contra 0,010 do controle positivo. É importante observar que o clone 2C não foi testado na proporção 2:1, pois não foi recuperado em concentração alta o suficiente para o ensaio (Figura 25B).

Figura 25. Ensaio de inibição da atividade hemolítica. Os fragmentos de anticorpo purificados foram pré-incubados com a peçonha (5,0 $\mu\text{g/mL}$) nas proporções 1:1 (A) e 2:1 (B) (scFv:peçonha) durante 2 horas a 4°C. A capacidade de inibição da hemólise foi avaliada após adição da solução de hemólise e incubação por 2 horas a 37°C. Como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de scFv.

5.6.2. Inibição da atividade proteolítica

Inicialmente, avaliou-se a capacidade de inibição da atividade de protease da peçonha pelos fragmentos de anticorpo purificados. Os scFvs foram pré-incubados com a peçonha nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) e, após adição do substrato e incubação por 3 horas a 37°C seguida de centrifugação, o teor de peptídeos no sobrenadante foi avaliado em espectrofotômetro ajustado para 280 nm. Por comparação com o controle positivo, em que foi adicionado peçonha na ausência de scFv, aparentemente nenhum clone foi capaz de inibir a atividade proteolítica (Figura 26). Para cada clone foi feito um controle com tempo zero de reação (TCA adicionado antes do substrato) para verificar se os fragmentos de anticorpo poderiam causar aumento significativo na absorvância.

Figura 26. Ensaio de inibição de protease com scFv. Os fragmentos de anticorpo purificados foram pré-incubados com a peçonha nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) e a capacidade de inibição da atividade proteolítica foi avaliada após incubação da mistura com meio de reação contendo caseína desnaturada como substrato. A reação foi interrompida com TCA 10% e, após centrifugação, os peptídeos no sobrenadante foram avaliados por leitura em espectrofotômetro ajustado para 280 nm. Para cada clone foi feito um controle com tempo zero de reação, em que os fragmentos de anticorpo e a peçonha foram desnaturados com TCA antes da adição do substrato. Como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de scFv. Como branco, utilizou-se água. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Como nenhuma molécula de scFv foi capaz de inibir a atividade proteolítica da peçonha, optou-se por fazer um ensaio de inibição com fagos anticorpos monoclonais obtidos do sobrenadante de cultura. A placa secundária 1 foi preparada conforme descrito no item 4.8.6 e os fagos-anticorpos foram pré-incubados com a peçonha (não foi feita uma proporção como no ensaio anterior) por 2 horas a 4°C. Após adição do substrato, incubação por 3 horas a 37°C e centrifugação, os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro ajustado para 280 nm. Como pode ser observado na figura 27, as leituras foram muito mais elevadas do que aquelas para os ensaios com scFv (Figura 26). Isso se deve ao fato de ter sido utilizado sobrenadante de cultura (amostra com muito mais impurezas) em lugar de scFv purificado. As diferenças de absorvância entre o tempo 0 de reação e as amostras incubadas por 3 horas foram perceptíveis, indicando atividade de protease. Somente os controles negativos (2B e 4G) apresentaram diferença pequena, como era de se esperar, visto que não foi adicionada peçonha. As leituras mais altas nos controles negativo e positivo podem ser explicadas pela ausência de bactérias nos meios. Como os poços na placa secundária não foram infectados, nenhuma cultura cresceu e os componentes do meio não foram consumidos, permanecendo em solução e contribuindo para o aumento da absorvância.

Os clones 1B, 1C e 2A, por apresentarem menor diferença entre as amostras incubadas por 3 horas e o controle com tempo 0 de reação, foram selecionados para a produção de fagos-anticorpos precipitados. Foi realizado um novo ensaio de inibição de protease com esses fagos-anticorpos precipitados, no entanto, não foi percebida inibição da proteólise como era esperado (Figura 28).

Figura 27. Ensaio de inibição de protease utilizando sobrenadante de cultura. Fagos anticorpos monoclonais produzidos a partir da placa primária 1 foram testados quanto a sua capacidade de inibição da atividade proteolítica após pré-incubação com a peçonha bruta (2,5 μ g). A reação foi iniciada com a adição do substrato (caseína) e interrompida com TCA 10%. Após centrifugação, os peptídeos em solução foram avaliados em espectrofotômetro a 280 nm. Para cada clone foi feito um controle com tempo zero de reação, em que os fagos-anticorpos e a peçonha foram desnaturados com TCA antes da adição do substrato. Os poços 2B e 4G correspondem a controles negativos, sem peçonha, e os poços 8B e 10G correspondem a controles positivos, sem fagos. Como branco, utilizou-se água.

Figura 28. Ensaio de inibição de protease utilizando fagos-anticorpos monoclonais precipitados. Os fagos que apresentaram resultados mais promissores no ensaio anterior foram recuperados por precipitação com PEG/NaCl e utilizados em um ensaio de inibição de protease. Os fagos foram pré-incubados com a peçonha (2,5 µg) e a capacidade de inibição da atividade proteolítica foi avaliada após adição do substrato (caseína). A reação foi interrompida com TCA 10% e, após centrifugação, os peptídeos no sobrenadante foram avaliados em espectrofotômetro a 280 nm. Para cada clone foi feito um controle com tempo zero de reação. Como controle negativo, foi usado tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de fagos-anticorpos. Como branco, utilizou-se água.

5.6.3. Inibição da atividade de L-aminoácido oxidase

A inibição da atividade de L-aminoácido oxidase da peçonha foi inicialmente testada usando-se os fragmentos de anticorpo purificados. As moléculas de scFv foram pré-incubadas com a peçonha nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) por 2 horas a 4°C e sua capacidade de inibição foi avaliada após adição da solução de substrato. O meio de reação foi incubado por 1 hora e a reação interrompida com ácido sulfúrico. Como pode ser observado na figura 29, nenhum clone inibiu a enzima.

Como nenhum dos fragmentos de anticorpo apresentou ação inibitória sobre a L-aminoácido oxidase, optou-se por fazer um teste com fagos-anticorpos monoclonais obtidos a partir de sobrenadante de cultura. O ensaio foi feito de modo semelhante, entretanto, foram utilizados fagos-anticorpos em lugar de scFv e não foi feita uma proporção como no ensaio anterior. Os sobrenadantes de cultura foram obtidos de uma placa secundária

produzida a partir da placa primária 1. Como pode ser observado na figura 30, nenhum clone apresentou ação inibitória contra a atividade de L-aminoácido da peçonha.

Figura 29. Ensaio de inibição de L-aminoácido oxidase utilizando scFv. Os fragmentos de anticorpos purificados foram pré-incubados com a peçonha (8,3 µg/mL) nas proporções 1:1 e 2:1 (scFv:peçonha) e a capacidade de inibição da atividade de L-aminoácido oxidase foi avaliada após adição do substrato. A reação foi interrompida com H₂SO₄ e as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro ajustado para 490 nm. Como controle negativo, utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo, peçonha na ausência de scFv. Como branco, utilizou-se água. Os valores foram comparados com o controle positivo por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Figura 30. Ensaio de inibição de L-aminoácido oxidase utilizando sobrenadante de cultura. Fagos anticorpos monoclonais produzidos a partir da placa primária 1 foram pré-incubados com a peçonha (5,0 µg/mL) e a capacidade de inibição da atividade de L-aminoácido oxidase foi avaliada após adição do substrato. A reação foi interrompida com H₂SO₄ e as amostras foram avaliadas em comprimento de onda de 490 nm. Como controle negativo (4G e 8B), utilizou-se tampão em vez de peçonha e, como controle positivo (2B e 10G), peçonha na ausência de fagos-anticorpos. A, clones 1A a 4H; B, clones 5A a 8H; C, clones 9A a 12H.

6. Discussão

Muitos dos componentes responsáveis pela toxicidade de peçonhas são enzimas. Como exemplos, podemos citar fosfolipases A2, serinoproteases, metaloproteases e L-aminoácido oxidases, sendo que as fosfolipases A2 são consideradas por alguns autores os principais componentes tóxicos de muitas peçonhas animais (Campos et al., 2009; Espino-Solis et al., 2009; Gutierrez and Ownby, 2003). Casos de envenenamento por animais peçonhentos são um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Porém, assim como era feito no início do século XX, os antivenenos ainda são preparados através da hiperimunização de animais e coleta das imunoglobulinas. A terapia clássica tem funcionado ao longo dos anos, mas as ferramentas científicas atuais possibilitam o estudo e desenvolvimento de alternativas ainda mais eficientes.

O presente trabalho propôs a avaliação das atividades de fosfolipase A2, protease e L-aminoácido oxidase presentes na peçonha de serpentes da espécie *Lachesis muta rhombeata* e a seleção de fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv capazes de inibir essas enzimas.

A peçonha bruta foi primeiramente avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme pode ser observado na figura 5. Algumas proteínas apresentaram padrões de corrida diferentes quando na presença ou ausência de agentes redutores. Esse fato pode ser explicado pelo rompimento de ligações dissulfeto, desnaturação e conseqüente separação de polipeptídeos que davam origem a proteínas poliméricas. Dessa forma, muitas proteínas passam para a forma monomérica, o que diminui seu tamanho e garante uma distância maior de corrida. Como exemplo, podemos visualizar duas bandas próximas de 120 kDa nas canaletas A e B que não aparecem ou aparecem em quantidade muito menor nas canaletas D e E. Por outro lado, mesmo aquelas proteínas que já estão presentes na forma monomérica podem apresentar perfil eletroforético diferente. Isso também pode ser explicado pelo rompimento de ligações dissulfeto e desnaturação das proteínas. Desnaturadas, elas passam da forma globular para formas mais lineares, o que atrasa sua corrida. Magalhaes et al. (2003) também observaram algumas bandas semelhantes em ensaio de eletroforese sob condições não redutoras da peçonha de *L. muta muta*, outra subespécie também encontrada no Brasil. Deve-se destacar a presença de bandas fortes entre 20 e 30 kDa. Sanchez et al. (2000), em ensaio de eletroforese na presença de agentes

redutores, também observaram algumas bandas semelhantes na peçonha de *L. muta muta*, com destaque para as duas bandas próximas de 15 kDa.

A fosfolipase A2 é uma das enzimas mais bem estudadas devido ao fato de ser encontrada em quase todos os tipos celulares (da Silva Cunha et al., 2011). Já foram descritas diversas atividades farmacológicas relacionadas à atividade de PLA₂ presentes na peçonha de *L. muta*, como neurotoxicidade, mionecrose, hemólise, edema, entre outras (Fortes-Dias et al., 1999; Fuly et al., 2007). Fully et al. (1993) demonstraram a presença de 4 isoformas de PLA₂ presentes nessa peçonha e, mais tarde, Fortes-Dias et al. (1999) demonstraram a presença de 5 isoformas. No presente trabalho, apenas uma banda pôde ser observada no ensaio de zimograma para atividade fosfolipásica (Figura 8), indicando apenas uma isoforma, ou isoformas com massas moleculares semelhantes. Conforme descrito pelos autores supracitados, todas as isoformas observadas têm massas próximas de 15 kDa, resultado semelhante àquele encontrado no presente trabalho.

O ensaio hemolítico foi baseado na capacidade de as PLA₂s hidrolisarem a fosfatidilcolina presente na gema do ovo e liberarem ácidos graxos e lisofosfatidilcolina, a qual se acumula na membrana dos eritrócitos e promove sua lise (Bierbaum et al., 1979). O ensaio foi conduzido na presença de Ca²⁺, visto que o motivo de ligação ao cálcio é conservado em todas as classes de PLA₂ (Arni and Ward, 1996). Visando mimetizar as condições fisiológicas humanas, o ensaio foi realizado a 37°C e pH 7,4, levando-se em consideração que outros autores já demonstraram que a enzima apresenta atividade sob condições semelhantes (Damico et al., 2005b; Fuly et al., 2002). Conforme pode ser visto no gráfico da figura 6, existe uma relação de dose-resposta em relação à quantidade de peçonha utilizada e a taxa de hemólise observada. Mesmo concentrações baixas como cerca de 3 µg/mL foram capazes de promover hemólise evidente. Fortes-Dias et al. (1999), em ensaio em meio sólido contendo gema de ovo como substrato, também observaram elevada atividade fosfolipásica da peçonha laquética, inclusive, atividade oito vezes superior àquela observada para a peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, cuja principal toxina é uma PLA₂. Diferentemente, Kuch et al. (1996) não observaram atividade de PLA₂ na peçonha laquética em ensaios utilizando gema de ovo como substrato.

Além de fosfolipases, proteases também são responsáveis por grande parte da toxicidade da peçonha laquética. Algumas atividades farmacológicas já foram descritas como coagulação sanguínea mediante ação sobre o fibrinogênio, ação hipotensiva devido à

liberação de bradicinina a partir do cininogênio, ação hemorrágica, entre outras (Diniz and Oliveira, 1992; Sanchez et al., 1987; Silveira et al., 1989). No presente trabalho, a atividade proteolítica foi mensurada através da hidrólise do substrato (BSA ou caseína) e posterior avaliação dos peptídeos em solução. Para mimetizar as condições fisiológicas, a peçonha foi incubada em meio de reação com pH ajustado para 7,4 e temperatura de 37°C, levando-se em consideração que outros autores já demonstraram atividade enzimática sob condições semelhantes (Magalhaes et al., 2003; Sanchez et al., 2000).

A atividade proteolítica foi inicialmente avaliada em meio de reação contendo BSA como substrato. Mesmo após 3 horas de incubação, a atividade observada foi muito baixa, com valores de absorvância inferiores a 0,1 (Figura 9), o que seria um fator limitante para os ensaios de inibição, visto que a quantidade de peçonha disponível era pequena e grande quantidade seria gasta em cada ensaio. Pensando nisso, foram feitos ensaios variando-se o substrato e a temperatura para otimizar o ensaio de atividade proteolítica.

Em relação ao substrato, inicialmente, resolveu-se alterar o protocolo para preparo. Foram feitos ensaios com BSA preparado dissolvendo-o em água à temperatura ambiente e com BSA previamente desnaturado com solução alcalina. Essa alteração simples no modo de preparo do substrato resultou em um aumento da atividade proteolítica de aproximadamente 125%, enquanto os controles permaneceram praticamente inalterados (Figura 10). Uma possível explicação para o ocorrido é que a desnaturação do substrato permite maior acesso das enzimas aos sítios de clivagem, o que facilita a hidrólise. Não foram encontrados ensaios semelhantes na literatura. Alterando-se a metodologia para o preparo do substrato, a atividade de protease ficou mais evidente, porém, a quantidade de peçonha gasta em cada ensaio permaneceu elevada.

Foram feitos, então, ensaios variando-se a temperatura. Entretanto, os valores observados não foram altos o suficiente para justificar uma alteração da temperatura de incubação, visto que a idéia principal era mimetizar as condições fisiológicas. Como era de se esperar, a atividade enzimática aumentou com temperatura mais elevadas. Além disso, seriam necessários ensaios com outras temperaturas para se determinar a temperatura ótima e o ponto a partir do qual há uma queda de atividade. Esses ensaios de caracterização não foram feitos já que o trabalho envolveu a peçonha bruta e não proteases purificadas. Sanchez et al. (1995) fizeram ensaios de caracterização com uma protease purificada (fator hemorrágico LHF-I) e com a peçonha bruta de *L. muta muta*. Nos ensaios de estabilidade em

função da temperatura, as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperaturas diferentes, resfriadas rapidamente em banho de gelo e injetadas no dorso de camundongos, ratos Wistar e coelhos albinos para avaliar a ação hemorrágica. Os autores observaram atividade elevada quando as amostras foram pré-incubadas a 30°C e perda de aproximadamente 10% quando pré-incubadas a 40°C. A 50°C, a atividade caiu para aproximadamente 45% e 75% para a enzima pura e para a peçonha bruta, respectivamente. A 60°C a atividade foi próxima de 0 para a enzima pura e aproximadamente 40% para a peçonha. Acima dessas temperaturas, a atividade foi praticamente nula.

Visto que a temperatura de incubação foi mantida em 37°C e que a quantidade de peçonha gasta em cada ensaio permaneceu elevada, optou-se por testar outros tipos de substrato. A albumina sérica bovina é um substrato de preparo fácil por ser uma proteína bastante solúvel. Entretanto, o alto custo é um ponto negativo. A gelatina também é um possível substrato e tem, como ponto positivo, o baixo custo. Entretanto, concentrações elevadas não podem ser preparadas visto que o meio de reação pode solidificar. A caseína também é um substrato muito comum e já foi descrita por vários autores em ensaios proteolíticos envolvendo peçonhas ofídicas (Kuch et al., 1996; Sanchez et al., 1995; Sanchez et al., 1992; Ushanandini et al., 2006). Nesse ensaio, optou-se por utilizar BSA e caseína previamente desnaturados e a gelatina foi preparada com metade da concentração dos demais substratos para evitar solidificação do meio. Uma vez que a adição de TCA não promoveu a precipitação da gelatina, esta não pôde ser utilizada como substrato em meio líquido. Em relação aos demais substratos, a atividade foi cerca de 610% superior para a caseína, se comparada com o BSA. Diversos autores também compararam a atividade proteolítica (proteases fúngicas) sobre diferentes tipos de substratos e observaram níveis mais altos para a caseína, se comparada com BSA (Li et al., 2006; Wang et al., 2006; Yang et al., 2007). Outros autores demonstraram a atividade de proteases laquéticas sobre substratos que estão envolvidos em processos fisiológicos e cuja hidrólise está diretamente relacionada com o efeito tóxico da peçonha. Como exemplo, podemos citar o fibrinogênio, o plasminogênio e o cininogênio (Diniz and Oliveira, 1992; Magalhaes et al., 2003; Sanchez et al., 2000; Yarleque et al., 1989).

Como a caseína proporcionou atividade proteolítica muito mais acentuada, foi necessário padronizar novamente as concentrações de peçonha capazes de promover proteólise evidente. Otimizadas as condições de reação, mesmo a concentração mais baixa

testada (5,0 µg/mL) resultou em elevada atividade de protease, com diferença de absorvância de cerca de 0,160 em relação ao controle negativo. Ainda, é interessante lembrar que, nos ensaios iniciais envolvendo BSA não desnaturado, mesmo concentrações 25 vezes superiores de peçonha (125 µg/mL) não eram capazes de gerar leituras acima de 0,1, o que indica que o ensaio de atividade foi otimizado satisfatoriamente.

Mais de uma enzima com atividade proteolítica já foi descrita na peçonha de serpentes da espécie *L. muta muta*. Sanchez et al. (1995) descreveram uma metaloprotease, chamada LHF-I, com atividade hemorrágica e massa molecular de aproximadamente 100 kDa. O mesmo autor também purificou uma serinoprotease, com massa molecular de 33 kDa e atividade sobre a molécula de fibrinogênio (Sanchez et al., 2000). Diniz e Oliveira (1992) purificaram uma serinoprotease com aproximadamente 27 kDa e ação hipotensiva devida à liberação de bradicinina a partir de cininogênio. Magalhaes et al. (2003) descreveram duas proteases, chamadas TLE-B (44 kDa) e TLE-P (43 kDa) com ação tipo trombina que, na verdade, são a mesma enzima com massa molecular de 27 kDa e diferentes padrões de glicosilação. Com o objetivo de verificar a presença de serino e metaloproteases na peçonha de serpentes da espécie *L. muta rhombeata*, foram feitos ensaios na presença de inibidores específicos para cada tipo de protease. Conforme pode ser visto na figura 14, a incubação na presença de PMSF (inibidor de serinoproteases) promoveu diminuição da atividade, quando comparada com o controle positivo (sem inibidores), porém, mesmo com 4 mM de PMSF, a peçonha ainda manteve mais da metade de sua atividade. A incubação com EDTA (inibidor de metaloproteases) promoveu uma diminuição mais acentuada da atividade, porém, mesmo na concentração de 4 mM, a peçonha ainda manteve parte de sua atividade. Quando os inibidores foram incubados em conjunto, a concentração de 2 mM já foi suficiente para levar a atividade de protease para valores próximos do controle negativo e a concentração de 4 mM não resultou em nova queda de atividade. Apesar de haver diferença estatística entre esses valores (PMSF associado a EDTA nas concentrações de 2 e 4 mM cada) e o controle negativo, essa atividade basal pode ser, na verdade, devido à maior concentração de proteínas dissolvidas no meio (adição da peçonha) e não devido à atividade proteolítica. Esses resultados indicam a presença dos dois tipos de protease na peçonha, sendo que metaloproteases contribuem mais do que serinoproteases para a atividade proteolítica total.

Para confirmar a presença de mais de uma protease e estimar as massas moleculares, foi feito um zimograma para a atividade da enzima. Amostras de peçonhas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo caseína, sob condições não redutoras. Inicialmente, o ensaio foi feito com tampão de amostra sem SDS. Entretanto, após a revelação do gel, só foi possível visualizar um arraste mais claro correspondendo à ação proteolítica, mas que não possibilitava identificar o número de enzimas (dados não apresentados). Optou-se, então, por utilizar tampão de amostra com SDS. Esse detergente confere carga negativa às proteínas, o que pode causar sua desnaturação. Entretanto, algumas são capazes de renaturar quando o detergente é removido. Levando isso em consideração, após a eletroforese, o gel foi lavado para a remoção do SDS e, então, incubado para permitir ação proteolítica sobre a caseína dissolvida. Como pode ser observado na figura 15, aparentemente três bandas com massas moleculares aproximadas de 40, 35 e 24 kDa são responsáveis pela atividade proteolítica. Para verificar a ação de inibidores de serinoproteases e metaloproteases sobre cada enzima, foram feitos ensaios em que os géis foram incubados na presença de cada inibidor separadamente e em conjunto. Aparentemente, nenhuma das enzimas foi totalmente inibida por EDTA, apesar de aquela com 24 kDa ter tido sua atividade reduzida. Diferentemente, as três proteases foram inibidas por PMSF. Os resultados indicam que as 3 enzimas observadas no ensaio de zimograma são do tipo serinoproteases. Contraditoriamente, o ensaio de inibição da atividade em meio líquido demonstrou que o EDTA tem maior efeito inibitório sobre a ação proteolítica da peçonha do que o PMSF. É importante lembrar que nem todas as enzimas, principalmente aquelas com massas moleculares mais elevadas, são capazes de se renaturar quando o SDS é removido e que podem existir isoformas com tamanhos semelhantes. Isso pode explicar o aparecimento de apenas três bandas claras e a contradição observada nos dois ensaios envolvendo inibidores.

L-aminoácido oxidases são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa do substrato L-aminoácido para formar o α -cetoácido correspondente, amônia e peróxido de hidrogênio. São geralmente encontradas na forma glicosilada e homodimérica. Como dímeros, possuem massa molecular que varia de 110 a 150 kDa, sendo que cada monômero possui cerca de 50 a 70 kDa. Apesar de serem encontradas em diversos organismos, aquelas encontradas em peçonhas ofídicas representam as mais bem estudadas dessa classe de enzimas (Du and Clemetson, 2002). Em algumas espécies, chegam a representar 30% do

total de proteínas da peçonha (Ali et al., 2000). Algumas atividades farmacológicas já foram descritas como formação de edemas, citotoxicidade, agregação plaquetária, ação hipotensiva, apoptose de células endoteliais, o que pode contribuir para o sangramento prolongado na parede dos vasos danificados pela mordida, entre outras (Ahn et al., 1997; Ali et al., 2000; Braga et al., 2008; Li et al., 1994; Suhr and Kim, 1996). Apesar de bem descritas nas peçonhas de diversas serpentes, ainda existem poucos estudos descrevendo as L-aminoácido oxidases presentes em peçonhas laquéticas (Kuch et al., 1996; Sanz et al., 2008).

No presente trabalho, a atividade de L-aminoácido oxidase da peçonha foi avaliada por um método indireto baseado na deaminação oxidativa de L-leucina e conseqüente produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é reduzido pela peroxidase presente no meio usando OPD como substrato. Como pode ser observado na figura 17, há uma relação proporcional entre a concentração de peçonha e a atividade enzimática e, mesmo em concentrações baixas, a atividade de L-aminoácido oxidase foi elevada, se comparada com o controle negativo. Kuch et al. (1996) também observaram elevada atividade de L-aminoácido oxidase para a peçonha laquética, inclusive, valores 5 a 34 vezes superiores àqueles observados para diversas peçonhas botrópicas.

Visando à obtenção de fragmentos de anticorpos humanos capazes de inibir enzimas envolvidas com a toxicidade da peçonha de *L. muta rhombeata*, foi utilizada uma biblioteca genômica (Griffin, 1) de bacteriófagos que codificam scFv. O método de *bio panning* se mostrou eficiente para a seleção de fagos-anticorpos reconhecedores da peçonha bruta. Quatro turnos de seleção foram realizados e o aumento no número de lavagens entre cada turno foi capaz de aumentar a especificidade dos fagos pela peçonha bruta, conforme pode ser observado no ensaio imunoenzimático da figura 18. É importante observar que foram feitos controles com poços sensibilizados com BSA para verificar a interação dos fagos com proteínas diferentes da peçonha. Nos 4 turnos, os controles apresentaram valores próximos entre si e relativamente altos, o que pode ser explicado pela utilização de BSA, proteína presente em grande quantidade no leite (usado no passo de bloqueio em cada turno de seleção). Apesar de os fagos obtidos do primeiro e do segundo turnos terem apresentado baixa especificidade para a peçonha, aqueles obtidos do terceiro e do quarto turnos apresentaram especificidade significativamente mais alta do que os respectivos controles. Kulkeaw et al. (2009) selecionaram vários fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv pela técnica de *bio panning* contra uma neurotoxina purificada da peçonha de *Naja kaouthia*

e conseguiram taxas de sobrevivência de até 83% com o emprego de um clone em ensaios com 1x DL₁₀₀ da toxina. Mousli et al. (1999) também utilizaram a técnica de *Phage Display* para selecionar um clone capaz de reconhecer e neutralizar a principal neurotoxina da peçonha do escorpião *Androctonus australis*.

Após cada passo de seleção, o número de fagos eluídos foi estimado por titulação. Diferentemente de outros autores que só utilizaram um sistema de eluição (Kuba and Furukawa, 2009; Kulkeaw et al., 2009; Liu et al., 2009), é possível observar que a utilização de um tampão básico (triethylamina) e um ácido (glicina-HCl) foi interessante no processo de eluição. De acordo com a figura 17, mesmo após eluição básica, alguns fagos permaneceram ligados à matriz e foram eluídos com a solução ácida, o que aumentou o rendimento da eluição. Além disso, provavelmente são fagos diferentes, já que apresentam características bioquímicas diferentes, o que aumenta a probabilidade de seleção de fagos específicos para mais componentes da peçonha.

O quarto turno, por apresentar os melhores resultados, foi escolhido para a produção de fagos-anticorpos monoclonais. A especificidade de cada clone foi avaliada por ELISA e aqueles que apresentaram maior especificidade para a peçonha foram selecionados para a produção de fagos-anticorpos precipitados, os quais foram utilizados para a produção de fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv. Dos clones escolhidos, apenas o 1C não apresentou a especificidade esperada, conforme pode ser visto na figura 21.

Os fragmentos de anticorpos foram construídos para conter um sinal de exportação para o periplasma e dois marcadores, sendo estes uma cauda de hexa-histidina, que exibe forte interação por matrizes de íons metálicos, e um c-myc, que se liga ao anticorpo monoclonal 9E10. A purificação a partir do periplasma é interessante, visto que se trata de um ambiente oxidante que contém enzimas que catalisam a formação e o rearranjo de ligações dissulfeto, importantes para a manutenção da atividade de anticorpos completos e fragmentos. Ainda, por conter apenas uma parte do total de proteínas celulares, a purificação a partir desse ambiente é facilitada. Optou-se por um sistema de cromatografia de afinidade baseado em uma matriz de agarose ligada a níquel. Definidas as condições de eluição dos fragmentos de anticorpos da resina, todos os clones foram purificados de maneira semelhante e os resultados foram satisfatórios, visto que apenas uma banda evidente foi observada para cada clone (Figura 23). Entretanto, os rendimentos foram baixos (aproximadamente 200 µg de scFv para cada 250 mL de meio de cultura). A biblioteca

Griffin. 1 é rotineiramente utilizada em nosso laboratório e tem apresentado resultados satisfatórios (Oliveira et al., 2009; Soares and Barbosa, 2008; Tamarozzi et al., 2006). Entretanto, atualmente, a biblioteca *Griffin. 1* foi substituída pela *Tomlinson II*, uma versão mais moderna que possibilita duas maneiras diferentes de purificação, além das listadas acima. São elas, purificação por interação com proteína A e com proteína L. Os próprios autores indicam estas metodologias alternativas, visto que a purificação é mais eficiente (BioScience).

O primeiro experimento de inibição envolvendo fragmentos de anticorpos purificados foi um ensaio cinético de hemólise indireta. Os ensaios foram conduzidos nas proporções 1:1 e 2:1 de scFv e peçonha, nessa ordem. Apesar de as moléculas testadas serem específicas para a peçonha, apenas 4 apresentaram capacidade inibitória sobre PLA₂s. O clone 4E apresentou os melhores resultados, mantendo uma taxa de inibição de 100% durante 90 minutos na proporção 1:1, e durante todo o experimento na proporção 2:1. O clone 2C também aparenta ser um potencial inibidor da enzima. Também manteve 100% de inibição durante 90 minutos na proporção 1:1, porém, devido ao baixo rendimento, não foi possível realizar ensaios na proporção 2:1. Os clones 2F e 9F também inibiram a enzima quando incubados em ambas as proporções, porém, de forma parcial, com maior inibição na proporção 2:1. Levando-se em conta que a peçonha laquéica apresenta mais de uma isoforma de PLA₂ (Fortes-Dias et al., 1999; Fuly et al., 1993), podemos supor que os clones 2C e 4E provavelmente se ligam a uma região conservada em todas as isoformas, o que explicaria a inibição de 100% da atividade da enzima. Diferentemente, os clones 2F e 9F provavelmente se ligam a apenas algumas isoformas ou, caso se liguem a todas, agem de forma mais atenuada do que os clones 2C e 4E. No nosso laboratório, a técnica de *Phage Display* já foi utilizada para a seleção de fragmentos de anticorpos humanos contra PLA₂ de peçonhas botrópicas (Tamarozzi et al., 2006) e crotálicas (Oliveira et al., 2009), contra proteínas responsáveis pela abertura de canais de sódio da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (dados submetidos para publicação), contra componentes tóxicos da peçonha de abelhas africanizadas (dados submetidos para publicação), entre outras.

Para os demais ensaios de inibição envolvendo as atividades de protease e de L-aminoácido oxidase, nenhum dos fragmentos de anticorpos selecionados foi capaz de inibir a ação das enzimas. Eles são, provavelmente, específicos para outros componentes da peçonha. Também foram feitos ensaios com fagos-anticorpos monoclonais, mas,

novamente, nenhum clone mostrou capacidade inibitória sobre as enzimas testadas. Como os fagos foram obtidos a partir do sobrenadante de cultura, o erro associado ao ensaio é consideravelmente maior do que para ensaios com scFv, principalmente nos ensaios proteolíticos, em que são avaliados os peptídeos presentes em solução.

Em algumas peçonhas animais, a maior parte das proteínas são representadas por PLA₂s. Entretanto, para a peçonha de *Lachesis muta*, Sanz et al. (2008) demonstraram que as proteínas mais abundantes são metaloproteases (32-38%), serinoproteases (25-31%), PLA₂s (9-12%), lecitinas do tipo C específicas para galactose (4-8%) e L-aminoácido oxidases (3-5%). Considerando-se que a interação de fagos-anticorpos da biblioteca com componentes da peçonha acontece ao acaso, era de se esperar uma maior quantidade de fagos específicos para proteases e, também, alguns específicos para L-aminoácido oxidases. Entretanto, isso não foi observado. Para o caso de proteases, talvez porque os fagos específicos estejam sendo hidrolisados pelas próprias enzimas. Outra possível explicação seria que na peçonha analisada, a quantidade de proteases é menor do que aquela observada pelo autor supracitado.

Novas estratégias devem, então, ser consideradas para a seleção de fagos-anticorpos específicos para outros componentes tóxicos da peçonha além de fosfolipases A2.

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- Os ensaios de atividade de fosfolipase A2, protease e L-aminoácido oxidase foram padronizados de maneira satisfatória;
- A metodologia para determinação de atividade proteolítica foi otimizada satisfatoriamente, sendo que a quantidade de peçonha necessária para cada ensaio passou a ser 25 vezes menor do que aquela necessária inicialmente;
- A estratégia de seleção de fagos-anticorpos a partir da biblioteca *Griffin. 1* contra a peçonha bruta de *Lachesis muta rhombeata* demonstrou-se eficaz;
- A produção e purificação de fragmentos de anticorpos humanos a partir dos clones selecionados foi realizada com sucesso;
- Os clones 2C, 2F, 4C e 9F foram capazes de neutralizar a atividade hemolítica da peçonha em ensaios *in vitro*. Entretanto, os demais clones purificados não foram capazes de inibir as atividades de protease e de L-aminoácido oxidase.

8. Perspectivas

Visando à produção e purificação de fragmentos de anticorpos capazes de neutralizar as atividades de protease e L-aminoácido oxidase da peçonha bruta, novas estratégias de seleção devem ser analisadas. As enzimas serão parcialmente purificadas antes de serem utilizadas nos passos de seleção para aumentar a probabilidade de obtenção de fagos anticorpos específicos para os antígenos alvos. Os fragmentos de anticorpo específicos para cada componente da peçonha serão caracterizados bioquimicamente e sequenciados. Com o propósito de elaborar um antiveneno eficaz contra a peçonha de serpentes da espécie *Lachesis muta*, os fragmentos de anticorpos purificados serão avaliados em ensaios *in vivo* de miotoxicidade, cardiotoxicidade e letalidade.

9. Referências

- Abbott Laboratories, 2004, HUMIRA® - Product Monograph.
- Ahn, M.Y., Lee, B.M., Kim, Y.S., 1997, Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int J Biochem Cell Biol* 29, 911-919.
- Ali, S.A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J.M., Kayed, R., Faigle, M., Neumeister, B., Voelter, W., 2000, Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 384, 216-226.
- Alves, R.M., Antonucci, G.A., Paiva, H.H., Cintra, A.C., Franco, J.J., Mendonca-Franqueiro, E.P., Dorta, D.J., Giglio, J.R., Rosa, J.C., Fuly, A.L., Dias-Baruffi, M., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2008, Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151, 542-550.
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996, Phospholipase A2--a structural review. *Toxicon* 34, 827-841.
- Azzazy, H.M., Highsmith, W.E., Jr., 2002, Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35, 425-445.
- Baneyx, F., 1999, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-421.
- Bierbaum, T.J., Bouma, S.R., Huestis, W.H., 1979, A mechanism of erythrocyte lysis by lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 555, 102-110.
- BioScience, L.-S. Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J).
- Bochner, R. 2001. Acidentes com Animais Peçonhentos (SECRETARIA DE SAÚDE E DEFESA CIVIL - GOVERNO DO RIO DE JANEIRO).
- Braga, M.D., Martins, A.M., Amora, D.N., de Menezes, D.B., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Marangoni, S., Alves, C.D., Barbosa, P.S., de Sousa Alves, R., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., 2008, Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 51, 199-207.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., 2009, Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett* 583, 1736-1743.
- Campos, V.R., Abreu, P.A., Castro, H.C., Rodrigues, C.R., Jordao, A.K., Ferreira, V.F., de Souza, M.C., Santos Fda, C., Moura, L.A., Domingos, T.S., Carvalho, C., Sanchez, E.F., Fuly, A.L., Cunha, A.C., 2009, Synthesis, biological, and theoretical evaluations of new 1,2,3-triazoles against the hemolytic profile of the *Lachesis muta* snake venom. *Bioorg Med Chem* 17, 7429-7434.
- Carter, J., Saunders, V., 2007, *Virology: Principles and Applications*. Wiley.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 1998, Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36, 823-846.
- Ciscotto, P., Machado de Avila, R.A., Coelho, E.A., Oliveira, J., Diniz, C.G., Farias, L.M., de Carvalho, M.A., Maria, W.S., Sanchez, E.F., Borges, A., Chavez-Olortegui, C., 2009, Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 53, 330-341.
- Colombini, M., Fernandes, I., Cardoso, D.F., Moura-da-Silva, A.M., 2001, *Lachesis muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon* 39, 711-719.
- Costa Torres, A.F., Dantas, R.T., Toyama, M.H., Diz Filho, E., Zara, F.J., Rodrigues de Queiroz, M.G., Pinto Nogueira, N.A., Rosa de Oliveira, M., de Oliveira Toyama, D., Monteiro, H.S., Martins, A.M., Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon* 55, 795-804.
- Costa Torres, A.F., Dantas, R.T., Toyama, M.H., Diz Filho, E., Zara, F.J., Rodrigues de Queiroz, M.G., Pinto Nogueira, N.A., Rosa de Oliveira, M., de Oliveira Toyama, D.,

-
- Monteiro, H.S., Martins, A.M., 2010, Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon* 55, 795-804.
- da Silva Cunha, K.C., Fuly, A.L., de Araujo, E.G., 2011, A phospholipase A(2) isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells in vitro. *Toxicon*.
- Damico, D.C., Bueno, L.G., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., da Cruz-Hofling, M.A., Novello, J.C., 2005a, Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon* 46, 222-229.
- Damico, D.C., Lilla, S., de Nucci, G., Ponce-Soto, L.A., Winck, F.V., Novello, J.C., Marangoni, S., 2005b, Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim Biophys Acta* 1726, 75-86.
- Diniz, M.R., Oliveira, E.B., 1992, Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). *Toxicon* 30, 247-258.
- Dokmetjian, J.C., Del Canto, S., Vinzon, S., de Jimenez Bonino, M.B., 2009, Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 53, 375-382.
- Du, X.Y., Clemetson, K.J., 2002, Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 40, 659-665.
- Espino-Solis, G.P., Riano-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L.D., 2009, Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J Proteomics* 72, 183-199.
- Ferreira, T., Camargo, E.A., Ribela, M.T., Damico, D.C., Marangoni, S., Antunes, E., De Nucci, G., Landucci, E.C., 2009, Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon* 53, 69-77.
- Fortes-Dias, C.L., Jannotti, M.L., Franco, F.J., Magalhaes, A., Diniz, C.R., 1999, Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A2 inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA2 from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* 37, 1747-1759.
- Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimaraes, J.A., Melo, P.A., 2000, Myotoxic activity of an acidic phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon* 38, 961-972.
- Fuly, A.L., de Miranda, A.L., Zingali, R.B., Guimaraes, J.A., 2002, Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem Pharmacol* 63, 1589-1597.
- Fuly, A.L., Francischetti, I.M., Zingali, R.B., Carlini, C.R., 1993, Partial purification and some physicochemical properties of phospholipases A2 from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta*). *Braz J Med Biol Res* 26, 459-463.
- Fuly, A.L., Machado, A.L., Castro, P., Abrahao, A., Redner, P., Lopes, U.G., Guimaraes, J.A., Koatz, V.L., 2007, Lysophosphatidylcholine produced by the phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* snake venom modulates natural killer activity as a protein kinase C effector. *Toxicon* 50, 400-410.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Leon, G., Alape-Giron, A., Flores-Diaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., Calvete, J.J., 2009, Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics* 72, 165-182.
- Gutierrez, J.M., Ownby, C.L., 2003, Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.
- Hartree, E.F., 1972, Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48, 422-427.
- Hawgood, B.J., 1992, Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). *Toxicon* 30, 573-579.
- Hawgood, B.J., 1999, Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon* 37, 1241-1258.

- Huang, M.Z., Gopalakrishnakone, P., Chung, M.C., Kini, R.M., 1997, Complete amino acid sequence of an acidic, cardiotoxic phospholipase A2 from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra): a novel cobra venom enzyme with "pancreatic loop". *Arch Biochem Biophys* 338, 150-156.
- Instituto Vital Brazil 2010 (Rio de Janeiro).
- Iwamoto, M., Taki, T., Fujita, S., 2009, Selection of a biotin protein ligase by phage display using a combination of in vitro selection and in vivo enzymatic activity. *J Biosci Bioeng* 107, 230-234.
- JCVI, J.C.V.I.-. 2009. REPTILES DATABASE - *Lachesis stenophrys*.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ching, A.T., Carvalho, E., Faria, F., Nishiyama, M.Y., Jr., Ho, P.L., Diniz, M.R., 2006, *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics* 173, 877-889.
- Kochva, E., Nakar, O., Ovadia, M., 1983, Venom Toxins: Plausible Evolution from Digestive Enzymes. *American Zoologist* 23, 427-430.
- Kuba, H., Furukawa, K., 2009, An optimized procedure for efficient phage display of antibody fragments with a low folding efficiency. *Protein Expr Purif*.
- Kuch, U., Mebs, D., Gutierrez, J.M., Freire, A., 1996, Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). *Toxicon* 34, 714-717.
- Kulkeaw, K., Sakolvaree, Y., Srimanote, P., Tongtawe, P., Maneewatch, S., Sookrung, N., Tungtrongchitr, A., Tapchaisri, P., Kurazono, H., Chaicumpa, W., 2009, Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. *J Proteomics* 72, 270-282.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Li, F., Aitken, R., 2004, Cloning of porcine scFv antibodies by phage display and expression in *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol* 97, 39-51.
- Li, J., Yang, J., Huang, X., Ke-Qin, Z., 2006, Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process biochemistry* 41.
- Li, Z.Y., Yu, T.F., Lian, E.C., 1994, Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32, 1349-1358.
- Lima, R.M., Estevao-Costa, M.I., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ho, P.L., Diniz, M.R., Fortes-Dias, C.L., 2011, Phospholipase A2 inhibitors (betaPLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. *Toxicon* 57, 172-175.
- Liu, N., Wu, G., Li, H., Li, L., Xing, H., Zhang, C., Lu, H., 2009, A novel peptide isolated from phage display peptides library recognized by an antibody against connective tissue growth factor (CTGF). *Int Immunopharmacol* 9, 291-297.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Magalhaes, A., Ferreira, R.N., Richardson, M., Gontijo, S., Yarleque, A., Magalhaes, H.P., Bloch, C., Sanchez, E.F., 2003, Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136, 255-266.
- Maynard, J., Georgiou, G., 2000, Antibody engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 339-376.
- Mousli, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., Billiald, P., 1999, A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Lett* 442, 183-188.
- Oliveira, J.G., Soares, S.G., Soares, A.M., Giglio, J.R., Teixeira, J.E., Barbosa, J.E., 2009, Expression of human recombinant antibody fragments capable of partially inhibiting the phospholipase activity of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105, 84-91.

- Paschke, M., 2006, Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 2-11.
- Pluckthun, A., 1991, Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology (N Y)* 9, 545-551.
- Polhill, R.B., Jr., Pruitt, K.M., Johnston, R.B., Jr., 1978, Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. I. Experimental and mathematical analyses. *J Immunol* 121, 363-370.
- QIAexpressionist, T., 2003, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. .
- Riviere, G., Choumet, V., Audebert, F., Sabouraud, A., Debray, M., Scherrmann, J.M., Bon, C., 1997, Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 1-8.
- Roque, A.C., Lowe, C.R., Taipa, M.A., 2004, Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog* 20, 639-654.
- Rossignol, G., Merieau, A., Guerillon, J., Veron, W., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G., Orange, N., 2008, Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Microbiol* 8, 189.
- Russel, M., Model, P., 1989, Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J Virol* 63, 3284-3295.
- Sakurai, Y., Shima, M., Matsumoto, T., Takatsuka, H., Nishiya, K., Kasuda, S., Fujimura, Y., Yoshioka, A., 2003, Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. *Biochim Biophys Acta* 1649, 51-57.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001, Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez, E.F., Costa, M.I., Chavez-Olortegui, C., Assakura, M.T., Mandelbaum, F.R., Diniz, C.R., 1995, Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. *Toxicon* 33, 1653-1667.
- Sanchez, E.F., Freitas, T.V., Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G., Diniz, C.R., 1992, Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 30, 95-103.
- Sanchez, E.F., Magalhaes, A., Diniz, C.R., 1987, Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon* 25, 611-619.
- Sanchez, E.F., Santos, C.I., Magalhaes, A., Diniz, C.R., Figueiredo, S., Gilroy, J., Richardson, M., 2000, Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 378, 131-141.
- Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M.J., Rivera, E., Crescenti, E.J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Calvete, J.J., 2008, Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J Proteomics* 71, 46-60.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, M.d.S. 2010. Boletim Eletrônico Epidemiológico - situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública (Brasília).
- Serrano, S.M., Maroun, R.C., 2005, Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115-1132.
- SESA 1997. Ofídios - Acidente Lachético (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná - SESA).
- Sidhu, S.S., 2000, Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11, 610-616.
- Sidhu, S.S., 2001, Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng* 18, 57-63.
- Silveira, A.M., Magalhaes, A., Diniz, C.R., de Oliveira, E.B., 1989, Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int J Biochem* 21, 863-871.

-
- SINAN/SVS/MS 2009a. Casos de acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2008 (SINAN/SVS/MS).
- SINAN/SVS/MS 2009b. Casos de acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2009 (SINAN/SVS/MS).
- SINAN/SVS/MS 2009c. Óbitos por acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2009 (SINAN/SVS/MS).
- Smith, G.P., 1985, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, J., Kontermann, R.E., Embleton, J., Kumar, S., 2005, Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *FASEB J* 19, 331-341.
- Soares de Moura, R., Aguiar, A.S., Melgarejo, A.R., de Carvalho, L.C., 1998, Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. *Toxicon* 36, 771-780.
- Soares, S.G., 2005. Produção de anticorpos humanos recombinantes e sua aplicação na identificação de antígenos sexo-específicos em espermatozóides bovinos. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Soares, S.G., Barbosa, J.E., 2008, Application of recombinant antibody library for screening specific antigens in a bovine sperm cell subpopulation. *Livestock Science* 114.
- Stock, R.P., Massougboji, A., Alagon, A., Chippaux, J.P., 2007, Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nat Biotechnol* 25, 173-177.
- Suhr, S.M., Kim, D.S., 1996, Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 134-139.
- Tamarozzi, M.B., Soares, S.G., Marcussi, S., Giglio, J.R., Barbosa, J.E., 2006, Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1450-1457.
- Ushanandini, S., Nagaraju, S., Harish Kumar, K., Vedavathi, M., Machiah, D.K., Kemparaju, K., Vishwanath, B.S., Gowda, T.V., Girish, K.S., 2006, The anti-snake venom properties of *Tamarindus indica* (leguminosae) seed extract. *Phytother Res* 20, 851-858.
- Vilca-Quispe, A., Ponce-Soto, L.A., Winck, F.V., Marangoni, S., 2010, Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon* 55, 745-753.
- von Behring, E., Kitasato, S., 1890, The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Mol Immunol* 28, 1317, 1319-1320.
- Wang, R.B., Yang, J.K., Lin, C., Zhang, Y., Zhang, K.Q., 2006, Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. *Lett Appl Microbiol* 42, 589-594.
- Weir, D.M., 1996, Weir's handbook of experimental immunology, 5th Edition. Blackwell Science, Cambridge, Mass., USA.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., Hoogenboom, H.R., 1994, Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-455.
- Yang, J., Li, J., Liang, L., Tian, B., Zhang, Y., Cheng, C., Zhang, K.Q., 2007, Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. *Arch Microbiol* 188, 167-174.
- Yarleque, A., Campos, S., Escobar, E., Lazo, F., Sanchez, N., Hyslop, S., Marsh, N.A., Butterworth, P.J., Price, R.G., 1989, Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon* 27, 1189-1197.
- Zamudio, K.R., 1997, Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society* 62, 421-442.
- Zani, M.L., Moreau, T., 2010, Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie* 92, 1689-1704.

Zelanis, A., de Souza Ventura, J., Chudzinski-Tavassi, A.M., de Fatima Domingues Furtado, M., 2007, Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: an ontogenetic approach. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145, 601-609.

10. Apêndice

Solução salina tamponada com fosfato (PBS) – 10X concentrada pH 7,2

Reagentes	Quantidade
NaCl	58,4 g
Na ₂ HPO ₄	47,2 g
Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O	26,4 g
Água ultra pura	q.s.p 1 L

Meio LB caldo

Reagentes	Quantidade
LB	20g
Água ultra pura	q.s.p 1 L

Meio LB Agar

Reagentes	Quantidade
LB Agar	24,0 g
Água ultra pura	q.s.p 1 L

Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Gel de separação (12%)

Reagentes	Quantidade
Tris-HCl 2M pH 8,8	1,13 mL
Acrilamida:Bis (30:0,8%)	2,4 mL
Água ultra pura	2,3 mL
Temed	7 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	38 µL

Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Gel de empilhamento (12%)

Reagentes	Quantidade
Tris-HCl 2M pH 6,8	125 µL
Acrilamida:Bis (30:0,8%)	332 µL
Água ultra pura	1,47 mL
Temed	3 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	25 µL

Tampão de corrida (SDS-PAGE)

Reagentes	Quantidade
Tris base	3 g
Glicina	14,4 g
SDS 10% (p/v)	10 mL
Água ultra pura	q.s.p 1 L

Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução fixadora

Reagentes	Quantidade
Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	12% (v/v)
Formaldeído 37%	50 µL

Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução de etanol

Reagentes	Quantidade
Etanol	50% (v/v)

 Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução de tiosulfato

Reagentes	Quantidade
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	20 mg
Água ultra pura	q.s.p. 100 mL

Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução de nitrato de prata

Reagentes	Quantidade
AgNO_3	0,4 g
Formaldeído 37%	75 μL
Água ultra pura	q.s.p. 100 mL

Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução de carbonato de sódio

Reagentes	Quantidade
Na_2CO_3	6 g
Formaldeído 37%	50 μL
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,8mM	2 mL
Água ultra pura	q.s.p. 100 mL

Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução reveladora

Reagentes	Quantidade
Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	12% (v/v)

Solução para coloração do gel - coloração por prata

Solução de lavagem

Reagentes	Quantidade
Metanol	50% (v/v)

Solução para coloração do gel - coloração por coomassie

Solução corante

Reagentes	Quantidade
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25 g
Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	12% (v/v)
Água ultra pura	q.s.p. 100 mL

Solução para coloração do gel - coloração por coomassie

Solução descorante

Reagentes	Quantidade
Metanol	50% (v/v)
Ácido acético	12% (v/v)
Água ultra pura	q.s.p. 100 mL

11. Anexos