

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SISBI/UFU

IMON
615.341
02621
TSE/mem



1000218750

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS EM
PHAGE DISPLAY PELA INTERAÇÃO COM ANTICORPOS POLICLONais
ANTI-NEUWIEDASE DA PEÇONHA BRUTA DE

Bothrops neuwiedi pauloensis

Aluno: Rone Cardoso

Orientadora: Maria Inês Homsi Brandeburgo

Co-Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA – MG
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS EM
PHAGE DISPLAY PELA INTERAÇÃO COM ANTICORPOS POLICLONais
ANTI-NEUWIEDASE DA PEÇONHA BRUTA DE

Bothrops neuwiedi pauloensis

ALUNO: RONE CARDOSO

Orientadora: Maria Inês Homsi Brandeburgo

Co-Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS EM
PHAGE DISPLAY PELA INTERAÇÃO COM ANTICORPOS POLICLONAS
ANTI-NEUWIEDASE DA PEÇONHA BRUTA DE
Bothrops neuwiedi pauloensis

ALUNO: RONE CARDOSO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____

Examinadores:

Data da defesa: _____ / _____ / _____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

Uberlândia, _____ / _____ / _____

AGRADECIMENTOS

Aos colegas Carlos Roberto Prudêncio e Guilherme de Souza Lino pela intensa participação neste trabalho.

A professora Dra. Maria Inês Homsi Brandeburgo pela orientação e ensinamentos.

A todos do Laboratório de Genética Molecular e em especial, Renata, Ana Paula, Mila ... pelo convívio e amizade.

Ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart pela excelente co-orientação e oportunidades.

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais pela agradável convivência e aprendizado.

A professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues pela contribuição indispensável através de incentivos, conselhos, anticorpos e toxina.

Aos amigos Veterinários Rodrigo Suehara e Rogério Pinheiro pelo companherismo, presença e incentivo nos momentos difíceis.

Aos professores Sueli Cristina Ribeiro, Deise da Silva, Neide Maria Aparecida, Foued Salmen Spíndola, Amélia Hamaguchi, pela colaboração neste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os professores do departamento de Genética e Bioquímica.

Em fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
Introdução Geral.....	01
• Ofidismo.....	01
• Distribuição geográfica das serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	02
• Alterações clínicas do envenenamento.....	02
• Alguns componentes do veneno.....	03
• Metaloproteínases.....	04
• Veneno de <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	06
• Anticorpos neutralizantes dos venenos.....	07
• Phage Display.....	08
• “Biopanning”.....	11
• Aplicabilidade da técnica.....	11
Objetivos.....	15
Referências Bibliográficas.....	16
Introdução.....	24
Materiais e métodos.....	27
Resultados.....	35
Discussão.....	46
Conclusão	51
Referências Blbliográficas.....	52

Lista de Figuras

Figura 1: cDNA e seqüências de aminoácidos deduzida da Neuwiedase.....	07
Figura 2: Fago filamentoso	10
Figura 3: Esquema representativo do processo de “Biopanning”.....	12
Figura 4: Esquema representativo do “Colony Blotting”.....	32
Figura 5: Colônias azuis de <i>E. coli</i> ER2738 infectadas com fagos M13, os quais carreiam o gene β -galactosidase.....	35
Figura 6: Eletroforese das amostras amplificadas dos três ciclos de “Biopanning” em gel de poliacrilamida a 16% com SDS.....	37
Figura 7: Western blotting de um gel de poliacrilamida 16% com SDS corrido com fagos dos 1°, 2° e 3° ciclos de “Biopanning”, onde foram utilizados anticorpos policlonais anti Neuwiedase.....	38
Figura 8: Colônias bacterianas crescidas sobre a Membrana A (Hybond ECL – Sigma, com poros de 0,45 μ m) durante o “Colony blotting” dos fagos isolados em três ciclos de “Biopanning”, pela interação com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase.....	39
Figura 9: “Colony blotting” dos fagos isolados em três ciclos de “Biopanning”, pela interação com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase.....	40
Figura 10: Representação dos alinhamentos entre as seqüências de 10 peptídeos sintéticos e a Neu.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1: Títulos de fagos obtidos durante os 3 processos de “Biopanning”.....	36
Tabela 2: Estrutura primária e imunorreatividade dos peptídeos sintéticos expressos na superfície de fagos filamentosos.....	42
Tabela 3: Alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos da Neu e dos peptídeos sintéticos expressos em fagos.....	43
Tabela 4: Alinhamento dos motivos consenso Neu x clone com metaloproteinases de peçonhas de serpentes <i>Botropicas</i> descritas no Gene Bank.....	45

Lista de Abreviaturas

BCIP -	Bromochloroindolyl phosphato
BSA -	Soroalbumina bovina
°C -	Graus Celsius
Da -	Dalton
DTT -	Ditiotreitol
EDTA -	Etileno-diamino tetra-acetato
Elisa -	Enzyme linked immunosorbent assay
g -	Gramma
μg -	Micrograma
hs -	Horas
IPTG -	Isopropil α -D-tiogalactosideo
kDa -	Quilodaltons
μL -	Microlitro
L -	Litro
μm -	Micrometro
MA -	Miliamper
M -	Molar
NBT -	Nitroblue tetrazolium
Neu -	Neuwiedase
Ng -	Nanograma
OD -	Densidade óptica
p/v -	Peso por Volume
PAGE -	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PEG -	Polietilenoglicol
pH -	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D -12 mer -	“Phage display” contendo peptídeos sintéticos com 12 aminoácidos.

RPM -	Rotações por Minuto
SDS -	Dodecil Sulfato de Sódio
TBST -	Tampão Tris-NaCl contendo Tween 20
TBS -	Tampão Tris- NaCl
v/v -	Volume por Volume
Xgal -	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosideo

RESUMO

Neuwiedase (Neu) é uma metaloproteinase fracamente hemorrágica componente da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada). No presente trabalho, utilizou-se um soro de anticorpos policlonais contra Neu, capazes de neutralizar os efeitos hemorrágicos da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Estes anticorpos foram utilizados para selecionar peptídeos imunorretivos de uma biblioteca de peptídeos sintéticos com 12 aminoácidos, expressos na superfície do capsídeo viral de bacteriófagos (“Phage display”). O processo consiste basicamente em vários ciclos de seleção (“Biopanning”). Após três ciclos de “Biopanning” foram obtidos 86 clones de fagos, destes 53 foram seqüenciados, resultando em 48 seqüências peptídicas diferentes. No total, 35 destas seqüências apresentaram imunorreatividade positiva através do ensaio de “Colony Blotting”, onde foram utilizados os anticorpos policlonais anti-Neuwiedase. Provavelmente, não foi possível determinar todos os epítópos da toxina, porém, o sitio 40NTVNGFFRSMN51 da Neu foi o local onde houve o maior número de alinhamentos, indicando este sítio como um provável epítopo. Os motivos **NLGM** e **KYN** presentes na Neu e nos clones Bn13 e Bn22, respectivamente, ocorrem também nas metaloproteinases não hemorrágicas LHF-II, fibrolase e lebetase da peçonha da serpente *Lachesis muta muta* e ACLPREF de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, Adamalysina-II de *Crotalus adamanteus*, Atroxase, Atrolysina-C e Ht-b de *C. atrox*. Estes motivos também estão presentes nas metaloproteinases hemorrágicas BOJUMET I, BOJUMET II e BOJUMET III de *Bothrops jararacuçu*, além da toxina ativadora de protrombina Berythreactivase de *Bothrops erythromelas*. A toxina Bap 1 de *Bothrops asper* possui os motivos **TKYN** e **NXFRS** comuns com a Neu e os peptídeos Bn 22 e Bn 13 respectivamente. Estes peptídeos selecionados podem apresentar um potencial uso na produção de soro antiofídico ou até mesmo como antígenos vacinais. Para esta finalidade, estes clones serão testados muito em breve quanto a sua imunogenicidade *in vivo*.

ABSTRACT

Neuwiedase (Neu) is a weakly bleeding metalloproteinase, component of the *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. On the present work, it was used polyclonal antibodies against Neu, capable of neutralizing the bleeding effects of the brute venom of *Bothrops neuwiedi pauloensis*. These antibodies were used to select immunoreactive peptides by the “Phage Display” technology. This technique basically consists in many peptide selection cycles (“Biopanning”) of 12 aminoacid synthesized peptides from a library, expressed on the surface of bacteriophage viral capsides. After three “Biopanning” cycles, 86 phage clones were obtained, 53 of them were sequenced, resulting in 48 different peptide sequences. On total, 40 of these sequences presented positive immunoreactivity through the “Colony Blotting” assay, from where it was used the anti-Neuwiedase polyclonal antibodies. Probably, it was not possible to determine all the toxin epitopes, however, the Neu 40NTVNGFFRSMN51 site was the place where there was the highest alignment numbers, indicating this site as a probable epitope. The **NLGM** and **KYN** motifs present on Neu and on the Bn13 and Bn22 clones, respectively, also occur on the non-bleeding metalloproteinases LHF-II, fibrolase e lebetase on the venom of *Lachesis muta muta* and ACLPREF of *Agkistrodon contortrix laticinctus*, Adamalysina-II of *Crotalus adamanteus*, Atroxase, Atrolynsina-C e Ht-b of *C. atrox*. These motifs are also present on the bleeding metalloproteinases BOJUMET I, BOJUMET II and BOJUMET III of *Bothrops jararacuçu*, besides the protrombine activating toxine Berythracitivase of *Bothrops erythromelas*. The Bap 1 toxin of *Bothrops asper* has the **TKYN** and **NXXFRS** motifs, in common with Neu and the Bn 22 e Bn 13 peptides, respectively. These selected peptides can present a potential use on the antivenoms production, or even as vaccinal antigens. To this use, these clones are going to be tested very soon to their immunogenicity *in vivo*.

INTRODUÇÃO GERAL

Ofidismo

O ofidismo representa um problema de saúde pública, nos países em desenvolvimento, em virtude de sua grande freqüência, gravidade e seqüelas deixadas nos acidentados (SOERENSEN, 1990). Das 69 espécies peçonhentas existentes no Brasil, 32 pertencem ao gênero *Bothrops* (representado pelas jararacas), seis ao gênero *Crotalus* (casca-véis), duas ao gênero *Lachesis* (surucucus) e 29 ao gênero *Micrurus* (corais), sendo que a maior incidência de acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops* (87,5%), seguida pelos gêneros *Crotalus* (8,5%), *Lachesis* (3,2%) e *Micrurus* (0,8%) (RIBEIRO et al., 1993); resultando em um alto índice de acidentes ofídicos, que ocorrem principalmente na área rural e na periferia dos grandes centros (20.000 casos/ano). Casos de ofidismos provocados pelas serpentes do gênero *Bothrops* não apresentam uma alta letalidade (0,31%), porém devido à alta incidência, são considerados de grande importância epidemiológica no país (FUNASA, 1999).

Em medicina veterinária, no Brasil, os dados estatísticos de acidentes com ofídios relacionados ao gênero envolvido não são precisos. Acredita-se que a distribuição dos gêneros envolvidos nesses acidentes seja semelhante aos dados humanos (FONTEQUE et al., 2001). Os acidentes ocorrem geralmente em locais onde existem muitos roedores, por acúmulo de lixo ou por armazenamento de grãos, onde o ofídio vai buscar seu alimento; ou quando os animais domésticos invadem o habitat natural das serpentes, que ao serem molestadas atacam, normalmente em locais de vegetação alta e à noite, quando se alimentam. Em campos de cultura (arrozais, cafezais etc.) e locais onde há desequilíbrio ecológico, a ausência de predadores promove um aumento na população ofídica e, consequentemente, um aumento de acidentes (BOFF, MARQUES, 1996). Grandes perdas econômicas ocorrem devido à morte de animais de rebanho, vítimas de envenenamento por ofídeos, pois o tratamento destes animais é economicamente inviável devido ao elevado preço do soro antiofídico.

Distribuição geográfica das serpentes *Bothrops neuwiedi*

Dentre as 32 espécies de *Bothrops* encontradas no Brasil a *B. neuwiedi* é constituída por 12 subespécies, segundo padrões de coloração e áreas de ocorrência: *B. neuwiedi neuwiedi* (Bahia), *B. neuwiedi bolivianus* (Bolívia e Oeste do Mato Grosso), *B. neuwiedi diporus* (Argentina, Leste do Paraguai, Mato Grosso do Sul e Paraná), *B. neuwiedi goyazensis* (Goiás e Distrito Federal), *B. neuwiedi lutzi* (Bahia, ao longo do Rio São Francisco), *B. neuwiedi mattogrossensis* (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, além de uma população isolada na região de Humaitá, AM), *B. neuwiedi meridionalis* (Rio de Janeiro e Espírito Santo), *B. neuwiedi paranaensis* (Paraná, Sul e Sudoeste de São Paulo), *B. neuwiedi pauloensis* (cerrados do Estado de São Paulo, Sul de Goiás e Triângulo Mineiro), *B. neuwiedi pubescens* (Rio Grande do Sul e Uruguai) e *B. neuwiedi urutu* (Minas Gerais e Leste de São Paulo) (CAMPBELL, LAMAR, 1989).

Alterações clínicas do envenenamento

O envenenamento botrópico é caracterizado por uma série de alterações patológicas que podem ser divididas didaticamente em duas formas clínicas: sistêmica e local (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1999). As principais alterações sistêmicas são representadas por distúrbios na hemostasia, os quais compreendem alterações na agregação plaquetária, distúrbios na coagulação e depleção do fibrinogênio (HATI et al., 1999). Além disto pode ocorrer sudorese, hipertensão arterial e hipotermia. No local da picada ocorre dor, edema persistente de grau variável, geralmente de instalação precoce e caráter progressivo. É comum o surgimento de equimoses e hemorragias, além da instalação de bolhas durante a evolução do quadro clínico, podendo estas se associar à necrose (CARDOSO, 1997). Os fatores determinantes da gravidade dos efeitos locais são a quantidade de veneno inoculada, o tempo entre a picada e o início da soroterapia, peso e idade do acidentado, região anatômica onde ocorreu a picada e uso ou não de torniquete (FRANÇA, 1997).

Alguns componentes do veneno

Um típico veneno de serpente pode conter várias centenas de proteínas as quais devem ser compreendidas para o bom entendimento dos complexos mecanismos patológicos envolvidos no envenenamento e na produção de anticorpos com boa especificidade para a produção de soro antiofídico (MENEZES, 2002). Além disto, a complexidade e variedade dos alvos com os quais as toxinas do veneno interagem especificamente, fazem delas importantes candidatas para o desenvolvimento de drogas e outras ferramentas biológicas.

As propriedades mais relevantes das peçonhas de serpentes são devidas principalmente a duas classes de enzimas: as proteases (serinoproteases e metaloproteinases) e as fosfolipases A₂, que desencadeiam uma série de alterações patológicas onde se destacam os efeitos sobre a hemostasia, mionecrose e edema. Fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas lipolíticas que clivam especificamente a ligação sn-2-acyl dos fosfolipídeos de membrana para produzir quantidades equimolares de lisofosfatídeos e ácidos graxos livres, principalmente o ácido araquidônico. Estes produtos então se tornam disponíveis para a conversão em potentes mediadores próinflamatórios, como o fator ativador de plaquetas e os eicosanóides (DENNIS, 1978; CHANG et al., 1987).

A maior parte das serinoproteinases encontradas no veneno botrópico possuem atividade tipo trombina ("thrombin like") (KAMIGUTI, SANO-MARTINS, 1995). A conversão do fibrinogênio em coágulos de fibrina pela ação da trombina é o evento central na coagulação sanguínea. O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática solúvel, formada por três pares de cadeias não idênticas A-α, B-β e γ, com massas moleculares de 63.500, 56.000 e 47.000 Da, respectivamente (MARKLAND, 1998).

A conversão do fibrinogênio em coágulo de fibrina pode ser dividida em três etapas: a primeira etapa consiste na proteólise do fibrinogênio, que ocorre por meio da hidrólise das cadeias A-α e B-β resultando na liberação de pequenos fragmentos denominados fibrinopeptídeos A e B, respectivamente. Em seguida ocorre a polimerização dos monômeros liberados pela trombina, possivelmente em consequência das interações eletrostáticas pelos grupos que foram expostos pela ação enzimática. Forma-se então o coágulo "frouxo" de fibrina, pois ainda

não existe ligação cruzada entre esses monômeros (WITE et al., 1976). O coágulo “denso” de fibrina é formado por ação do fator XIIIa, que promove a ligação cruzada entre as cadeias laterais de lisina e glutaminil, formando um polímero de fibrina insolúvel. A ativação deste fator se dá por meio de ação da trombina sobre o fator XIII (proenzima) convertendo-o em fator XIII ativo. A maioria das “thrombin-like” não são capazes de ativar o fator XIII, desta maneira há formação somente do coágulo “frouxo” (COLMAN et al., 1993).

As metaloproteinases constituem um importante grupo de enzimas proteolíticas presentes nos venenos botrópicos; elas compreendem uma série de enzimas “zinc dependentes” com diferentes massas moleculares que são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico destes envenenamentos (BJARNASON, FOX, 1994). Além disto, elas degradam proteínas da matriz extracelular, têm efeito citotóxico nas células endoteliais e atuam em componentes do sistema hemostático (KAMIGUTI et al., 1996). Algumas metaloproteinases induzem hemorragias por afetar diretamente capilares sanguíneos, clivam componentes peptídicos da membrana basal e assim afetam a integridade entre membrana basal e células endoteliais (GUTIÉRREZ, RUCAVADO, 2000).

Metaloproteinases

Metaloproteinases são enzimas hidrolíticas do tipo endopeptidases que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para manifestação de suas atividades. Estas enzimas variam amplamente em filogenia (de bactérias até mamíferos) e nas suas atividades *in vivo* (BLUNDELL, 1994).

De acordo com similaridades seqüenciais, as metaloproteinases zinco dependentes são classificadas em 4 grupos distintos (HOOPER, 1994):

1- **Zincinas**: contém a seqüência conservada **HEXXH**, como motivo de ligação ao zinco; 2- **Inverzincinas**: possui o domínio Zincina invertido (**HXXEH**) de ligação ao zinco; 3- **Carboxipeptidase**: que possui o motivo de ligação ao zinco, **HXXE**; e 4- **DD-carboxipeptidase**: que apresenta o motivo de ligação ao zinco **HXH**.

Para ligação ao metal, todos os grupos possuem como 1º e 2º ligantes resíduos de histidina, exceto as carboxipeptidases. Já o terceiro ligante pode ser um resíduo de histidina (exceto nas inverzincinas) ou um ácido glutâmico (zincinas e inverzincinas). O maior grupo é representado pelas zincinas, subdivididas em gluzincinas (aqueles em que o terceiro ligante do zinco é o ácido glutâmico) e metzincinas (cujo terceiro ligante do zinco é uma histidina). O grupo das gluzincinas é composto pelas famílias das termolisina, endopeptidase-24.11, aminopeptidase, enzima conversora angiotensina, endopeptidase-24.15 e neurotoxinas do tétano e do botulismo. As metzincinas possuem um motivo conhecido como "Met-turn" caracterizado pela presença de uma metionina em volta da estrutura terciária localizada na região C-terminal em relação ao motivo de ligação do zinco (HEBXHXBGBXH...M). Esta metionina não é essencial para a atividade enzimática (BUTLER et al., 2004). Astacinas, serratias, matrixinas (metaloproteinases de matriz) e metaloproteinases presentes em venenos de serpentes são famílias pertencentes ao grupo Metzincinas.

A estrutura das metaloproteinases de peçonhas apresenta sempre um domínio catalítico, podendo conter ainda um domínio desintegrina e um domínio rico em Cisteína. A atividade hemorrágica destas metaloproteinases varia de acordo com sua estrutura. Hite et al. (1994) classificaram as metaloproteinases em quatro classes distintas:

-PI: Metaloproteinases que possuem somente o domínio catalítico e massa molecular entre 20 a 30 kDa. Este grupo apresenta baixa ou nenhuma atividade hemorrágica.

-PII: Metaloproteinases que possuem o domínio catalítico seguido por um domínio disintegrina na região carboxiterminal, com massa molecular entre 30 a 60 kDa.

-PIII: Metaloproteinases formadas pelo domínio catalítico, domínio disintegrina e um domínio rico em Cisteína, massa molecular entre 60 a 80 kDa. Estão inclusas nesta classe proteínas com alta atividade hemorrágica.

-PIV: Compreende um grupo de enzimas que possuem, além dos três domínios descritos na classe PIII, um polipeptídeo tipo lectina, ligado por uma ponte disulfeto à cadeia polipeptídica da metaloproteinase, a massa molecular pode variar de 80 a 100 kDa.

Veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*

O veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* possui poucos componentes identificados, dentre os quais se destacam dois fatores hemorrágicos denominados de NHFa e NHFb, com massas moleculares de 46 e 58 kDa, respectivamente. Ambas são toxinas ácidas de pI 4,5 e 4,3, possuem uma única cadeia polipeptídica, são altamente hemorrágicas e degradam a caseína. De acordo com Mandelbaum et al. (1884), agentes quelantes podem inibir suas atividades.

Também isolada do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, a Neuwiedase (Neu) é uma metaloproteinase composta por 198 aminoácidos de massa molecular de 22 kDa e ponto isoeletírico 5,9. É uma metaloproteinase da classe P-I que apresenta somente o domínio metaloproteinase da proteína madura. Sua estrutura primária foi deduzida com base na seqüência de cDNA conforme mostrado na figura 1, produto de uma reação RT-PCR com o RNA extraído da glândula de veneno da serpente. A Neu apresenta atividade fibrinogenolítica e baixa atividade hemorrágica, demonstrando atividade proteolítica sobre a fibrina e alguns componentes da matriz extracelular. Resultados experimentais em camundongos mostraram que esta toxina não induz hemorragia quando injetada no músculo gastrocnêmio, porém provocou sangramento em músculo cremáster e causou hemorragia pulmonar somente em doses maiores que 5ug/g, via intravenosa. A estrutura primária da Neu foi alinhada com algumas metaloproteinases não hemorrágicas, mostrando uma similaridade estrutural de 71% entre a Neu, Adamalisina II e Atroxase (RODRIGUES et al., 2000, 2001).

1	CAG CAG AGA TTC TTT CCA CAA AGA TAC ATA GAG CTT GTC ATA GTT GCA	48
1	<u>Q</u> Q R E F P Q R Y I E L V I V A	16
49	GAT CGG AGA ATG TAC ACT AAA TAC AAC AGC GAT ACT AAT AAA ATA AGA	96
17	<u>D</u> R R M Y T K Y N S C S N K I R	32
97	ACA CGG GTA CAT GAA CTT GTC AAC ACT GIA AAT GGG TTT TTC AGA TCT	144
33	T R V H E L V N T V N G F F R S	48
145	ATG AAT GTT GAT GCC TCA CTG GCT AAC CTA GAA GTT TGG TCC AAA AAG	192
49	M N V D A S L A N L E V W S K K	64
193	GAC CTT ATC AAA GTG GAA AAA GAC AGT AGT AAA ACT TTG ACT TCA TTT	240
65	D L I K V E K D S S K T L T S F	80
241	GGA GAA TGG AGA GAG AGA GAT TTG CTG AGG CGC AAA AGT CAT GAT AAT	288
81	G E W R E R D L L R R K S H D N	96
289	GCT CAG TTA CTC ACG GCC ATT GAC TTC ATG GGA AAT ACT ATA GGA AGA	336
97	A Q L L T A I D F N G N T I G R	112
337	GCT TAC CTC GGA AGC ATG TGC AAC CCA AAA AGA TCT GIA GGA ATT GTC	384
113	A Y L G S M C N P K R S V G I V	128
385	CAG GAT CAT AGT CCA ATA AAT CTC TTG GIG GCA GTC ACA ATG GCC CAT	432
129	O D H S P I N L L V G V T M A H	144
433	GAG CTG GGT CAT AAT CTG GGC ATG GAA CAT GAT GGA AAA GAT TGT CTT	480
145	<u>E</u> L G H N L G M E H D G K D C L	160
481	TGC GGA GCT AGT TTA TGC ATT ATG AGT CCC GGG TTA ACA GAT GGA CCA	528
161	C G A S L C I M S P G L T D G P	176
529	TCC TAT GAG TTC AGC GAT TGC AGT AAA GAT TAT TAT CAG ACA TTT CTT	576
177	S Y E F S D C S K D Y Y Q T F L	192
577	ACA AAT CAT AAT CCC CAG	594
193	T N H N P Q	198

Figura 1. cDNA e seqüências de aminoácidos deduzida da Neuwiedase. Os nucleotídeos estão representados na parte superior da linha e os aminoácidos estão logo abaixo. Os aminoácidos sublinhados presentes na região N-terminal (em cima) e no sítio ativo (em baixo) foram seqüenciados para confirmar a seqüência (RODRIGUES et al., 2000).

Anticorpos neutralizantes dos venenos

A ocorrência de domínios conservados nas metaloproteinases dos venenos de serpentes é um aspecto importante na produção de anticorpos neutralizantes; as regiões imunogênicas e altamente conservadas destas toxinas podem induzir a formação de anticorpos capazes de neutralizar as ações de várias toxinas diferentes do mesmo veneno, e de toxinas presentes em venenos distintos (HARRISON et al., 2003). Rodrigues et al. (2001) produziram anticorpos policlonais anti-Neuwiedase, os quais, foram capazes de neutralizar a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. neuwiedi*, evidenciando imunidade cruzada entre a Neu e outras toxinas hemorrágicas do veneno bruto. Desta forma foi sugerida a presença de epítópos comuns entre a Neu e domínios

metaloproteinase de toxinas com grandes massas moleculares que ocorrem nos venenos.

“Phage display”

Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos é uma ferramenta importante para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas de interesse, e no desenvolvimento de novas vacinas. É um método de seleção no qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral (AZZAZY, HIGHSMITH, 2002). Com isto, é possível a correlação entre cada seqüência de proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA (ADDA et al., 2002).

Smith em 1985, foi o pioneiro em conseguir a expressão da enzima de restrição *Eco RI* como uma fusão da proteína oito (pIII) do capsídeo do fago. Tipicamente, utiliza-se o bacteriófago M13 (SIDHU, 2001), um vírus bacteriófago filamentoso que parasita bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam pilus F, o vírus utiliza maquinária de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Este bacteriófago não provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (AZZAZY, HIGHSMITH, 2002). Vetores virais como o fago lambda (STERNBERG, HOESS, 1995), bacteriófagos T4 e P4 (HOUSHMAND et al., 1999; LINDQVIST, NADERI, 1995), além dos vírus de eucariotos, tais como baculovírus, também podem ser utilizados neste processo (BOUBLIK et al., 1995).

O vetor M13KE, derivado do vetor de fagos m13mp19 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago helper. Além disto, o gene *lacZ* presente neste vetor facilita a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas das colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (MESSING et al., 1977; MESSING, 1983). O vetor M13KE permite a construção e propagação de bibliotecas de “Phage display” pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de seqüências e diversidade (BARBAS et al., 2001).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 2B). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (PHIZICKY, FIELDS, 1995; BRÍGIDO, MARANHÃO, 2002). Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao pilus F da célula bacteriana. Ela apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo (LUBKOWSKI et al., 1998; HOLLIGER et al., 1999), ilustrado na figura 2C. Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas pVIII ligadas (BRÍGIDO, MARANHÃO, 2002).

Em sistemas onde todas as pIII ou pVIII são utilizadas, o tamanho da proteína inserida no vetor é limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo. Este sistema “Phage display” foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (no máximo 30 aminoácidos) (PHIZICKY, FIELDS, 1995).

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo (anticorpos, peptídeos, enzimas, receptores de superfície celular etc.) por um processo de seleção *in vitro* denominado “Biopanning” (PARMLEY, SMITH, 1988).

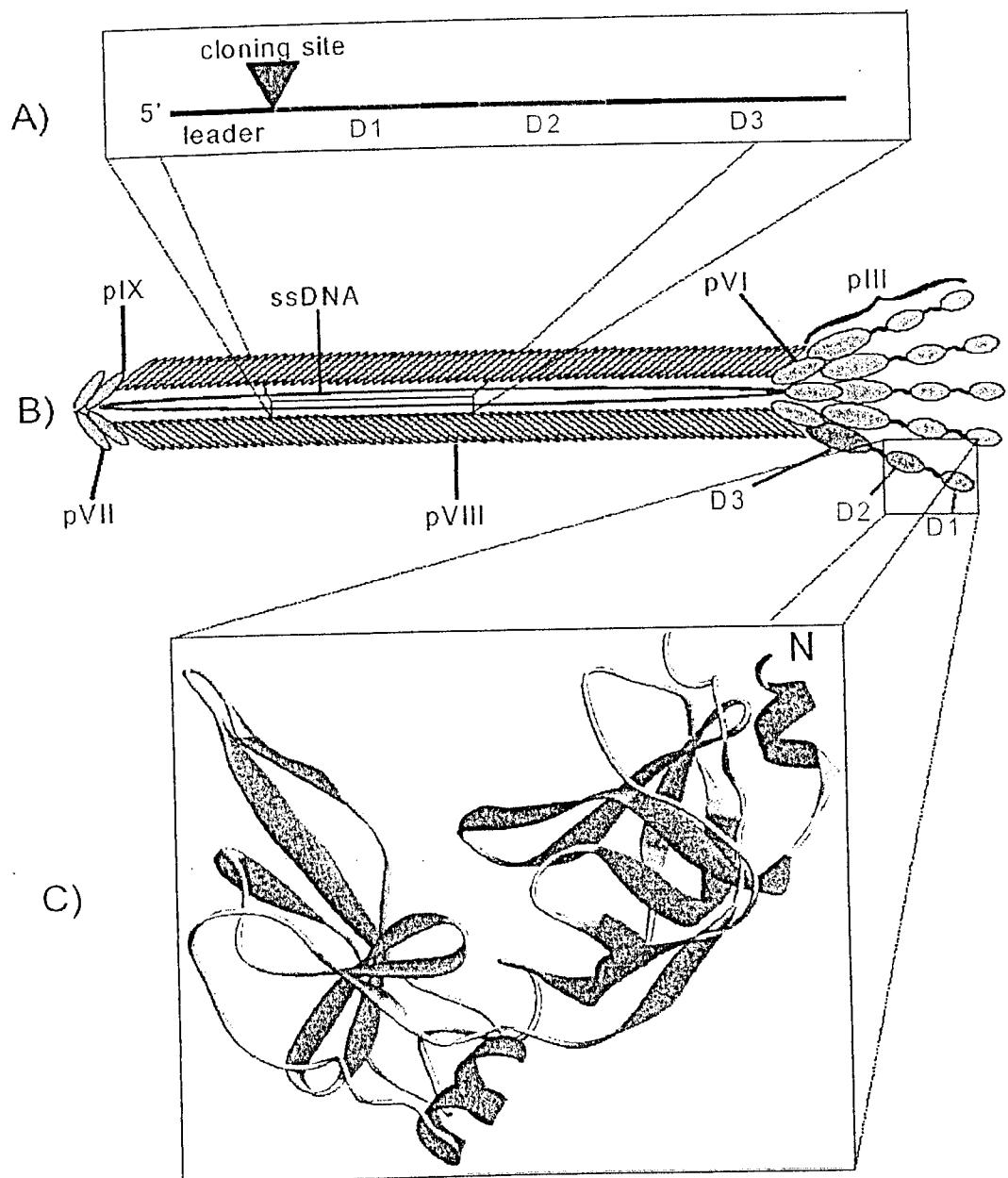


Figura 2- Fago filamentoso. A) Composição do gene III, mostrando o sitio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX; C) Cristalografia dos domínio D1 e D2 da proteína III (HOLLIGER, WILLIAMS, 1999), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em ciântico.

“Biopanning”

Um ciclo completo de “Biopanning” está representado na figura 3 abaixo (intens 1 a 6). Neste processo a molécula alvo é imobilizada em um suporte sólido, geralmente uma placa de ELISA, mas também se utiliza “beads”, resinas ou membranas, então uma população de fagos em solução é incubada com a molécula alvo. Os fagos contendo peptídeos sintéticos com afinidades pelo alvo são capturados e permanecem ligados; já os fagos não ligados (não específicos) são eliminados por sucessivas lavagens. O pool de fagos ligados ao alvo é então eluído e amplificado (crescido em *Escherichia coli*). Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos a um novo “Biopanning” (ligação ao alvo, eluição e amplificação) visando o enriquecimento das seqüências específicas para o alvo. Após três ou quatro repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas seqüências de DNA podem ser obtidas por sequenciamento (BARBAS et al., 2001).

O processo de eluição dos fagos ligados a alvos protéicos imobilizados compreende um ponto chave nos protocolos de seleção, algumas alterações realizadas neste processo durante o primeiro passo de seleção por afinidade, podem levar ao isolamento de clones com maior afinidade para a molécula alvo. D'Mello e Howard (2001), por exemplo, testaram tampões de eluição com pHs decrescentes, enquanto Gaskin et al. (2001) usaram a solução de proteína alvo como tampão de eluição e Yu et al. (2003) utilizaram tampão de baixo pH e proteína alvo para a eluição. Como resultado, todos obtiveram aumento na seleção de clones fortemente ligantes às respectivas proteínas.

Aplicabilidade da técnica

Anticorpos protetores contra doenças infecciosas reconhecem peptídeos extraídos de bibliotecas sintéticas como seus epítopos. Estes peptídeos são capazes de induzir a formação de anticorpos efetivos contra a doença (DEMANGEL et al., 1998; LUNDIN et al., 1996).

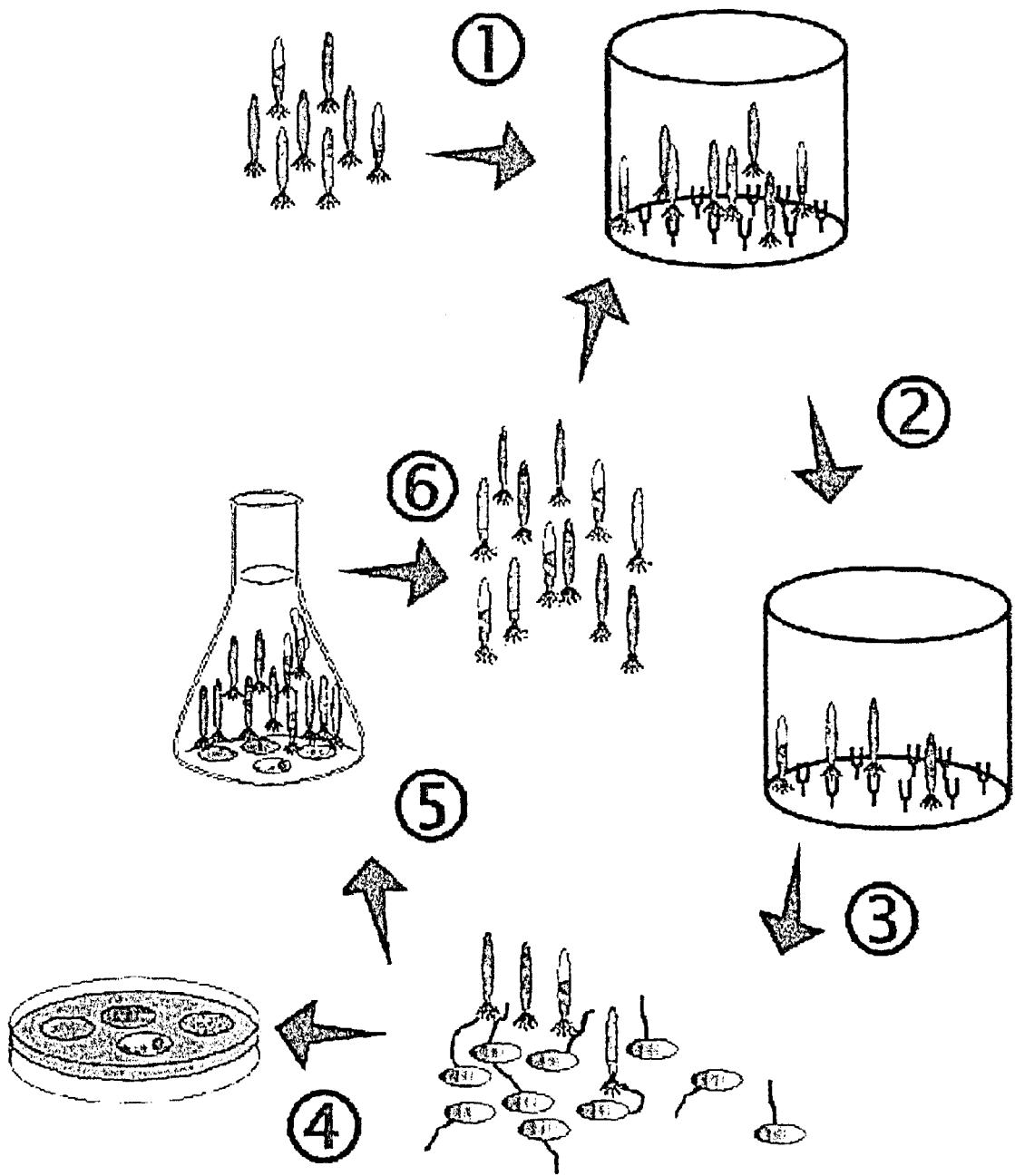


Figura 3- Esquema representativo do processo de “Biopanning”. 1) Incubação da biblioteca de fagos com o alvo imobilizado; 2) Retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas; 3) Eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli* com pili F; 4) Titulação dos fagos eluídos; 5) Amplificação dos fagos eluídos; 6) População de fagos com maior afinidade pelo alvo.

Peptídios sintéticos dispersos em fagos podem se ligar a receptores hormonais (CWIRLA et al., 1997; DOORBAR, WINTER, 1994; WRIGHTON et al., 1996), proteínas (BALASS et al., 1993; DENNIS et al., 2000) e componentes inorgânicos (WHALEY et al., 2000) e assim elucidar suas moléculas alvo.

“Phage display” é utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em órgãos específicos. Neste caso a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos, homogeneizados e mantidos em suspensão com *E. coli* (RAJOTTE et al., 1998).

Em todos os casos citados acima, as bibliotecas de peptídeos expressos em fagos mostraram complexidades suficientes para conter múltiplas seqüências de DNA capazes de codificar os peptídeos de interesse. Ensaios foram realizados para desenvolver métodos alternativos, tais como a expressão de bibliotecas de peptídeos sintéticos na superfície de bactérias (“Cell display”) (FUCHS et al., 1991), leveduras (BODER, WITTRUP, 1997) ou diretamente no DNA plasmidial (bibliotecas de peptídeos em plasmídeos) (CULL et al., 1992). Porém, todos estes sistemas resultaram em alterações nas células hospedeiras, e foram ineficazes em produzir bibliotecas com grandes diversidades de peptídeos (baixa complexidade) (AZZAZY, HIGHSIMTH, 2002).

O potencial das toxinas, especialmente as de peçonhas, para o desenvolvimento de novas drogas, vacinas e outras moléculas de interesse farmacológico ou cosmético vêm enfocando as interações destas com receptores, anticorpos, proteínas ou componentes não protéicos; assim, a técnica de “Phage display” foi perfeitamente adequado para a obtenção de tais objetivos. Demangel et al. (2000) selecionaram peptídeos ligantes para a crotoxina, principal proteína neurotóxica de *Crotalus durissus terrificus*, os quais produziram anticorpos neutralizantes contra o veneno bruto desta serpente e ainda reduzindo o efeito tóxico da crotoxina. Gazarian et al. (2000) e Hernandez et al. (2002) isolaram um grupo de mimetópos e mapearam os epítópos de uma toxina do veneno de *Centruroides noxius* (escorpião), pelo uso de um anticorpo monoclonal. Dois mimetópos isolados reproduziram as funções básicas dos epítópos nativos, incluindo sua antigenicidade, porém sem os efeitos tóxicos observados quando a toxina é utilizada. Kasher et al. (2001) isolaram peptídeos sintéticos com afinidade

de ligação a anticorpos produzidos contra a α -bungarotoxina, um componente neurotóxico da peçonha da serpente *Bungarus multicinctus*, e tais peptídeos também produziram anticorpos neutralizantes da ação tóxica da α -bungarotoxina.

Wu et al. (2001) selecionaram alguns peptídeos sintéticos de uma biblioteca, os quais mimetizam (mimetopos) os epítopos de dois anticorpos monoclonais, neutralizantes das neurotoxinas tipo A (BT57-1 e BT150-3) do *Clostridium botulinum*. Apesar de pouca ou nenhuma identidade estrutural entre os peptídeos sintéticos e as toxinas, eles verificaram a capacidade dos mimetopos induzirem a produção de anticorpos efetivos em neutralizar as toxinas.

Os soros antiofídicos são produzidos em animais, geralmente cavalos, utilizando-se o veneno bruto como imunógeno. Contudo, estes animais apresentam descaimento de sua resistência orgânica que pode resultar em óbito (10% dos animais utilizados na produção de soro morrem durante o processo de imunização) devido à alta toxicidade do veneno e também pela utilização de adjuvantes (RIBEIRO et al., 1993). Deve-se ressaltar também que, no caso da imunização com veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, ocorre lesão no local do inoculo, debilitando bastante o animal. Um dos principais efeitos patológicos das peçonhas botrópicas consiste nas hemorragias, geralmente ocasionadas pelas metaloproteinases. O estudo destas enzimas, descoberta de domínios conservados e epítopos comuns são importantes para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes capazes de evitar a ação hemorrágica de várias toxinas diferentes por reação imunológica cruzada. Daí vem o interesse na utilização da tecnologia de “Phage display”, associada aos conhecimentos estruturais das metaloproteinases.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo isolar possíveis mimetopos que alinham com a Neuwiedase, e também em motivos conservados de metaloproteinases botrópicas, além de mapear possíveis epítopos da Neu.

Referências bibliográficas

ADDA C. G.; ANDERS R. F.; TILLEY L.; FOLEY M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. **Comb. Chem. High Throughput. Screen.**, v.5, p.1-14, 2002.

AZZAZY H. M.; HIGHSMITH JR. W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin. Biochem.**, v.35, p.425-445, 2002.

BALASS M.; HELDMAN Y.; CABILLY S.; GIVOL D.; KATCHALSKI-KATZIR E.; FUCHS S. Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.90, p.10638-10642, 1993.

BARBAS C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, S. J. G. **Phage Display a Laboratory Manual**. 2001.

BJARNASON J.B.; FOX J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 352-372, 1994.

BLUNDELL T.L. Metalloproteinase super-families and drug desing. **Nature Struct. Biol.** v. 1, p. 73-75, 1994

BODER E. T.; WITTRUP K. D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. **Nat. Biotechnol.** v.15, p.553-557, 1997.

BOFF G. J.; MARQUES M. G. Animais Peçonhentos. Módulo 7. **Curso de especialização por tutoria à distância**. Brasilia-DF Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. p.67., 1996.

BOUBLIK Y.; DI BONITO P.; JONES I. M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis

virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. **Biotechnology**. v.13, p.1079-1084, 1995.

BRÍGIDO M. M.; MARANHÃO A. Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS **Biotecnologia Ciéncia & Desenvolvimento**. N.26, 2002.

BUTLER G. S.; TAM E. M.; OVERALL C. M. The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (Gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: Probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloproteinase superfamily. **J. Biol. Chem.** Ainda não publicado, 2004.

CAMPBELL J. A; LAMAR W. W. The Venomous Reptiles of Latin America. **Cornell Univ. Press**, 1989.

CARDOSO J.L.C. Ofídios – *Bothrops* (jararaca, cruceira). In: Nicolela A.; Barros E.; Torres J. B. **Acidentes com Animais Peçonhentos**. Ministério da Saúde 1997.

CHANG J.; MUSSER J.H.; MC. GREGOS H. Phospholipase A2 function and pharmacological regulation. **Biochem Pharmacol.**, v.36, p.2429-2436, 1987.

COLMAN R. W.; MARDER V. J.; SALZMAN E. W. Hemostasis and Trombosis. **JB Lippencott Company**. 3.ed., 1993.

CULL M. G.; MILLER J. F.; SCHATZ P. J. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the *lac* repressor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.89, p.1865-1869, 1992.

CWIRLA S. E.; BALASUBRAMANIAN P.; DUFFIN D. J.; WAGSTROM C. R.; GATES C. M.; SINGER S. C.; DAVIS A. M.; TANSIK R. L.; MATTHEAKIS L. C.; BOYTOS C. M.; SCHATZ P. J.; BACCANARI D. P.; WRIGHTON N. C.; BARRETT R. W.; DOWER W. J. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. **Science**. v.276, p.1696-1699, 1997.

DEMANGEL C.; MAROUN C. R.; ROUYRE S.; BON C.; MAZIÉ J. C., CHOUMET V. Combining phage and molecular modeling to map the epitope of a neutralizing antitoxin antibody. **Eur. J. Biochem.** v.267, p.2345-2353, 2000.

DEMANGEL C.; ROUYRE S.; ALZARI P. M.; NATO F.; LONGACRE S.; LAFAYE P.; MAZIE J. C. Phage-displayed mimotopes elicit monoclonal antibodies specific for a malaria vaccine candidate. **Biol. Chem.** v.379, p.65-70, 1998.

DENNIS E. A. Phospholipase A2 mechanism inhibition and role in arachidonic acid release. **Drug. Dev. Res.**, v.10, p. 205-220, 1978.

DENNIS M. S.; EIGENBROT C.; SKELTON N. J.; ULTSCH M. H.; SANTELL L.; DWYER M. A.; O'CONNELL M. P.; LAZARUS R. A. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. **Nature**. v.404, p.465-470, 2000.

D'MELLO F.; HOWARD C. R. An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. **J. Immunol. Methods**. v.247, p.191–203, 2001.

DOORBAR J.; WINTER G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. **J. Mol. Biol.** v.244, p.361-369, 1994.

FRANÇA, F.O.S. Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan/SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. **Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 1997.

FONTEQUE J.H.; BARROS FILHO I.R.; SAKATE M. Acidentes Botrópicos de Interesse em Animais Domésticos. **Revista Educação continuada**. CRMV-SP – v.4, p.102-111, 2001.

FUCHS P.; BREITLING F.; DUBEL S.; SEEHAUS T.; LITTLE M. Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. **Biotechnology**. v.9, p.1369-1372, 1991.

FUNASA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1999.

GASKIN D.H.; STARCK K.; TURNER N.A.; VULFSON E. N. Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification, **Enzyme Microb. Technol.** v.28, p.766-772, 2001.

GAZARIAN T., SELISKO B., HÉRION P., GAZARIAN K. Isolation and characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **Molecular Immunology**. v.37, p.755-766, 2000.

GUTIÉRREZ J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**. v.82, p.841-850, 2000.

HARRISON R. A.; WUSTERB W.; THEAKSTON R.D.G. The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody Theakstona. **Toxicon**. v.41, p.441-449, 2003.

HATI R.; MITRA P.; SARKER S.; BHATTACHARYYA K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.29, p.1-19, 1999.

HERNANDEZ R., GAZARIAN G.T., HÉRION S.H., GAZARIAN G.K. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. **Immunology Letters**. v.80, p97-103, 2002.

HITE L.A.; JIA L.G.; BJARNASON J.B; FOX J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to

mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** v.308, p.182-191, 1994.

HOLLIGER P.; WILLIAMS R. L. RIECHMANN L.; Crystal structure of the two Nterminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: Evidence for conformational lability. **J. Mol. Biol.** v.288, p.649-657, 1999.

HOOPER N. M. Families of zinc metaloproteases. **FEBS Letters.** v.354, p.1-6, 1994.

HOUSHMAND H.; FROMAN G.; MAGNUSSON G. Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. **Anal. Biochem.** v.268, p.363-370, 1999.

KAMIGUTI A. S.; HAY C. R. M.; ZUZEL M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of a2b1-integrin by the snake venom metalloproteinase Jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p.635-641, 1996.

KAMIGUTI A. S.; SANO-MARTINS I. S. South American Snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v.14, p.359-374, 1995.

KASHER R.; BALASS M.; SCHERF T.; FRIDKIN M.; FUCHS S.; KATCHALSKI-KATZIR E. Design and synthesis of peptides that bind K-bungarotoxin with high affinity. **Chemistry & Biology.** v.8, p.147-155, 2001.

LINDQVIST B. H.; NADERI S. Peptide presentation by bacteriophage P4. **FEMS Microbiol. Rev.** v.17, p.33-39, 1995.

LUBKOWSKI, J.; HENNEKE, F.; PLÜCKTHUN, A. AND WLODAWER, A. The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure domains of g3p. **Nature Struct. Biol.** v.5, p.140-147, 1998.

LUNDIN K.; SAMUELSSON A.; JANSSON M.; HINKULA J.; WAHREN B.; WIGZELL H.; PERSSON M. A. Peptides isolated from random peptide libraries on phage elicit a neutralizing anti-HIV-1 response: analysis of immunological mimicry. **Immunology**. v.89, p.579-586, 1996.

MANDELBAUM F. R.; ASSAKURA M. T.; REICHL A. P. Characterization of two hemorrhagic factor and proteases isolated from the venom do three species of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**. v.22, p.193-196, 1984.

MENEZES A. Animal Toxins and New Methodologies. Perspectives in Molecular Toxinology, Wiley, **West Sussex**, p.97-106, 2002.

MARKLAND F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. **Thromb. Haemost.** v., p. 668.

MESSING J. New M13 vectors for cloning. **Methods Enzymol.** v.101, p.20-78 1983.

MESSING J.; GRONENBORN B.; MULLER H.B.; HANS H.P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *Hind*II fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.74, p.3642-3646, 1977.

RAJOTTE D.; ARAP W.; HAGEDORN M.; KOIVUNEN E.; PASQUALINI R.; RUOSLAHTI E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. **J. Clin. Invest.** v.102, p.430-437, 1998.

PARMLEY S. F.; SMITH G. P. Antibody selectable filamentous fd phage vectors: Affinity purification of targets genes. **Gene**. v.17, p.305-318, 1988.

PHIZICKY E. M.; FIELDS S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiol.** v. 59, p.94-123, 1995.

RIBEIRO L. A.; PIRES DE CAMPOS V. A. F.; ALBUQUERQUE M. J.; TAKAOKA, N. Y.; Acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Assoc. Med.** v.39, p.4-7, 1993.

RODRIGUES V. M.; SOARES A. M.; ANDRIÃO-ESCARSOA S. H.; FRANCESCHIC A. M.; RUCAVADOC A.; GUTIÉRREZ J. M.; GIGLIO J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie.** v.83, p.471-479, 2001.

RODRIGUES V. M.; SOARES A. M.; GUERRA-SA' R.; RODRIGUES V.; FONTES M. R. M.; GIGLIO J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v.381, n.2, p.213–224, 2000.

SIDHU S. S. Engineering M13 for phage display. **Biomol. Eng.** v.18, p.57-63, 2001.

SMITH, GP (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the viron surface. **Science.** v. 228, p.1315-1317, 1985.

SOERENSEN, B. Animais Peçonhentos: Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. **Distribuição geográfica no Continente Americano.** p. 138, 1990.

STERNBERG N.; HOESS R. H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.92, p.1609-1613, 1995.

WITE A.; HANDLER P.; SMITH E. L. **Princípios de Bioquímica.** 5 ed. p.1070, 1976.

WHALEY S. R.; ENGLISH D. S., HU E. L.; BARBARA P. F.; BELCHER A. M. Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. **Nature**. v.405, p.665-668, 2000.

WRIGHTON N. C., FARRELL F. X.; CHANG R.; KASHYAP A. K.; BARBONE F. P.; MULCAHY L. S.; JOHNSON D. L.; BARRETT R. W.; JOLLIFFE L. K.; DOWER W. J. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. **Science**. v.273, p.458-464, 1996.

WU H. C.; YEH C. T.; HUANG Y. L.; TARN L. J.; LUNG C. C. Characterization of Neutralizing Antibodies and Identification of Neutralizing Epitope Mimics on the *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type A. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.7, p.3201-3207. 2001.

YU H.; DONG X. Y.; SUN Y. An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a phage display peptide library. **Biochemical Engineering Journal**. 2003.

1. INTRODUÇÃO

As metaloproteinases constituem um importante grupo de enzimas proteolíticas presentes nos venenos botrópicos, elas compreendem uma série de enzimas zinco dependentes com variada massa molecular que são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico destes envenenamentos (BJARNASON, FOX et al., 1994). Estas enzimas são enquadradas na família das Metzincinas, que compreende metaloproteinases carreadoras de um motivo conservado de ligação ao íon zinco (HEBXHXBGBXH), elas possuem um motivo conhecido como “Met-turn” caracterizado pela presença de uma metionina em volta da estrutura terciária localizada na região C-terminal em relação ao motivo de ligação do zinco (HOOPER, 1994).

Isolada do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, a Neuwiedase (Neu) é uma metaloproteinase com pequena massa molecular (22 kD), possui atividade fibrinogenolítica e baixa atividade hemorrágica, apresentando atividade proteolítica sobre a fibrina e alguns componentes da matriz extracelular. O alinhamento da estrutura primária da Neu com algumas metaloproteinases não hemorrágicas mostrou uma similaridade estrutural de 71% com a Adamalisina II de *Crotalus adamanteus* e a Atroxase de *Crotalus atrox*. Anticorpos policlonais anti Neuwiedase são capazes de neutralizar a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. neuwiedi*, evidenciando imunidade cruzada entre Neu e outras toxinas hemorrágicas do veneno bruto. Desta forma é sugerida a presença de epitopos comuns entre a Neuwiedase e metaloproteinases de grande massa molecular que ocorrem no veneno (RODRIGUES et al., 2000, 2001). A ocorrência de domínios conservados nas metaloproteinases dos venenos de serpentes é um aspecto importante na produção de anticorpos neutralizantes, as regiões imunogênicas e altamente conservadas destas toxinas podem induzir a formação de anticorpos capazes de neutralizar as ações de várias toxinas diferentes do mesmo veneno, e de toxinas presentes em venenos distintos (HARRISON et al., 2003). Assim, seqüências de aminoácidos que compõem os epitopos responsáveis pela imunorreatividade cruzada tornam-se importantes instrumentos, podendo ser utilizadas como antígenos vacinais.

Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos é uma importante ferramenta para mapear e identificar epítopes de proteínas alvo. A técnica baseia-se na seleção de peptídeos de uma biblioteca de peptídeos sintéticos expressos em bacteriófagos filamentosos, enquanto o material genético codificante para o peptídeo encontra-se no genoma viral (AZZAZY, HIGHSITH, 2002). Com isto, é possível a relação entre cada seqüência peptídica variante e sua respectiva seqüência de DNA (ADDA et al., 2002). Demangel et al. (2000) selecionaram peptídeos ligantes para a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, os quais produziram anticorpos neutralizantes contra o veneno bruto desta serpente e ainda reduziram o efeito tóxico da crotoxina. Gazarian et al. (2000) e Hernandez et al. (2002) isolaram um grupo de mimetopos e mapearam os epítopes de uma toxina do veneno de *Centruroides noxius* (escorpião), pelo uso de um anticorpo monoclonal. Dois mimetopos isolados reproduziram as funções básicas dos epítopes nativos, incluindo sua antigenicidade, porém sem os efeitos tóxicos observados quando a toxina é utilizada. Kasher et al. (2001) isolaram peptídeos sintéticos com afinidade de ligação a anticorpos produzidos contra a α -bungarotoxina, um componente neurotóxico da peçonha da serpente *Bungarus multicinctus*, tais peptídeos produziram anticorpos neutralizantes da ação tóxica da α -bungarotoxina.

A biblioteca de peptídeos sintéticos expressos em bacteriófagos (12 aminoácidos por peptídeo) foi empregada neste trabalho, para isolar peptídeos através das ligações destes com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase, selecionando desta forma peptídeos imunorreativos ao referido anticorpo e potencialmente utilizáveis como imunógenos vacinais, além da possível determinação de epítopes e isolamento de mimetopos com reação imunológica cruzada entre a Neu e outras metaloproteinases de peçonhas.

Neste trabalho, foram obtidos 86 peptídeos isolados de uma biblioteca de peptídeos sintéticos (12 aminoácidos por peptídeo) expressos no capsídeo viral de bacteriófagos M13. Destes, 45 peptídeos apresentaram imunorreatividade com anticorpos anti-Neuwiedase. Dentre os peptídeos imunorreativos apenas 10 apresentavam alinhamento com a estrutura primária da Neu. Os motivos consenso entre a Neu e os peptídeos sintéticos alinhados foram submetidos ao

banco de dados Gen Bank (Blast), onde observou-se alinhamentos entre estes motivos e quatro metaloproteinases serpentes do gênero *Bothrops*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do pool de anticorpos policlonais anti-Neuwiedase e da toxina

Os anticorpos IgGs produzidos em coelhos contra a metaloproteinase Neu, assim como a referida enzima são resultados do trabalho da Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues, que gentilmente cedeu alíquotas suficientes para a realização deste estudo.

2.3. “Biopanning” e titulações

Foi utilizada uma biblioteca de peptídeos randômicos com 12 aminoácidos fusionados em fagos (Ph.D -12 mer- New England Biolabs). A biblioteca era composta por doze aminoácidos randômicos seguidos por uma curta seqüência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N - terminal da proteína capsídica menos numerosa (Proteína III) de bacteriófagos filamentosos M13. A biblioteca consistia de $2,7 \times 10^9$ clones independentes. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos continham peptídeos randômicos amino-terminais. A biblioteca foi submetida à seleção contra uma gama de anticorpos anti-Neuwiedase policlonais, IgG produzidos em coelhos.

Foi adsorvido no orifício de uma placa de microtitulação de 96 pocinhos (Maxisorp;Nunc) 150 μ l de IgG (100ug/ml de IgG em 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6) e incubada “overnight” a 4°C em uma câmara úmida. A placa foi bloqueada com 250ul de um tampão de bloqueio (0,1M NaHCO₃, pH 8,6, 5mg/ml BSA) por uma hora, a temperatura de 4°C. A placa foi lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0,1% Tween-20). Então, foi acrescentado no mesmo orifício da placa 4×10^{10} fagos diluídos em 100ul de TBST e mantido sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem do orifício por dez vezes com TBST (0,1% Tween-20) no primeiro ciclo e nos subseqüentes ciclos de “Biopanning” com TBST (0,5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos com 100ul do tampão de eluição (0,2M glycine-HCl, pH 2,2, contendo 1mg/ml BSA) por 10 minutos, a temperatura ambiente e imediatamente neutralizado com 15ul do tampão de neutralização (1M Tris-HCl, pH 9,1).

Pequenas alíquotas do eluato de fagos foram utilizadas para a titulação. O eluato remanescente foi utilizado para a amplificação de fagos para o próximo ciclo pela infecção de *E. coli* ER2537.

A titulação é um procedimento necessário para determinar o volume do eluato que será incorporado ao próximo passo de "Biopanning"; neste volume deve haver $1-2 \times 10^{11}$ partículas virais.

Inicialmente retirou-se uma colônia (isolada) de ER2738 previamente crescida em meio sólido LB com tetraciclina; esta colônia foi incubada em meio LB líquido sob agitação, até atingir a fase de crescimento mid-log ($OD_{600}=0,5$).

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10^1 até 10^4 , no caso de soluções com fagos amplificados a faixa de diluição utilizada foi de 10^8 a 10^{11} . Então, em cada diluição foi acrescentado 200 μ l da cultura de ER2738 na fase mid-log. Esta mistura foi vortexada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células, assim infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3ml de Agarose Top a 45°C, (vertidos rapidamente) e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e Tetracilina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram vedadas com parafilme, invertidas e incubadas à temperatura de 37°C, durante 16 hs. Após este período, colônias azuis foram contadas e as placas possuidoras de, aproximadamente, 100 colônias foram identificadas como as portadoras das diluições que representaram os títulos.

2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A eletroforese foi realizada segundo ~~per~~ BARBAS et al. (2001). A concentração do gel foi de 16% (p/v). Foram utilizados dois tampões de corrida: tampão catodo (0,1M de Tricina, 0,1M de Trizma Base e 0,1% de SDS) e tampão anodo (0,2M de Tris-HCl pH 8,9). A corrente foi fixada em 10mA com voltagem variando entre 100 a 120V e o tempo de corrida foi de aproximadamente cinco hs. O tampão da amostra foi retirado de um estoque constituído por 12ml de SDS a 10% + 6ml de Glicerol + 1ml de 1M Tris-HCl pH 6,8 + 10ml de Água Deionizada + 1,2mg de Azul de Bromofenol seco.

2.4.1. Preparação das amostras

Amostras dos eluatos dos três ciclos de “Biopanning” (1×10^{10} partículas virais) foram pré-incubadas com o tampão da amostra associado com Ditiotreitol (DTT), um agente desnaturante (rompe pontes dissulfeto intra e intermoleculares), a 100°C por dois minutos. A quantidade de DTT usada foi de 12,3 mg para 400 μ l do tampão da amostra. O volume do referido tampão foi de 1:1 (v/v) com o volume da amostra.

2.4.2. Revelação do gel

Após a corrida, o gel foi corado com prata (SAMBROOK et al., 1989). Inicialmente ele foi incubado durante 12 hs com uma solução de Etanol:Ácido acético glacial:Água (30:10:60) para fixar as proteínas no gel. A solução fixadora foi então descartada e o gel incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob leve agitação com uma solução de Etanol 30%. Este passo foi repetido, a solução de etanol foi descartada e o gel incubado duas vezes com Água Deionizada, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e sob leve agitação. A água foi removida e uma solução de AgNO₃ 0,1% adicionada e descartada após 30 minutos. Após este processo os dois lados do gel foram lavados com Água Deionizada. Em seguida, uma solução aquosa de Carbonato de Sódio 2,5% e Formaldeído 0,02% foi acrescentada ao gel e mantida a temperatura ambiente, sob suave agitação. Com o surgimento das bandas a reação foi parada por Ácido Acético 1% e o gel foi lavado várias vezes com Água Deionizada.

2.5. “Western Blotting” (SAMBROOK et al., 1989).

Para análises de especificidade utilizando a técnica de “Western Blotting”, realizou-se a eletroforese (SDS-PAGE, 16%) em condições desnaturantes (uso de DTT) dos eluatos obtidos em cada ciclo do “Biopanning”, onde a quantidade de partículas virais foi a mesma nas três amostras (1×10^{10}). Após este procedimento, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (Hybond ECL com poros de $0,22\mu\text{m}$ da Sigma) através de eletrotransferência em um sistema úmido, utilizando-se uma corrente padronizada de 100mA e um tampão de transferência (Tris, Glicina, Água deionizada e metanol) “overnight”. Em seguida, a membrana de Nitrocelulose foi bloqueada com bloto (5% de leite desnatado, TBS 10x, 0,05% de Tween 20 e Água Deionizada), incubada a 4°C com o pool de anticorpos IgG policlonais anti-Neuwiedase (anticorpo primário) diluídos em bloto 5%, “overnight”, sob leve agitação. Após este período, o anticorpo primário foi removido e a membrana lavada cinco vezes com TBST 0,05%. Então, o anticorpo anti IgG de coelho (anticorpo secundário) complexado com a enzima fosfatase alcalina (Sigma) foi diluído 1/5000 em bloto 5%; esta solução foi incubada com a membrana, a temperatura ambiente, durante duas horas. A solução de anticorpos foi descartada e a membrana lavada cinco vezes com TBST 0,05%. Por fim, houve a revelação da membrana com o substrato NBT/BCIP.

2.6. “Colony blotting”

Para a identificação dos clones imunoreativos foi utilizado um método alternativo desenvolvido por Minenkova et al. (2000), onde bactérias infectadas com os fagos de interesse (uma colônia para cada fago) cresceram brevemente em uma placa de Elisa. Com o auxílio de um repicador, foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (Hybond ECL – Sigma) com poros de $0,45\mu\text{m}$ (Membrana A). A Membrana A foi posicionada sobre outra membrana de Nitrocelulose (Hybond ECL – Sigma), com poros de $0,22\mu\text{m}$ (Membrana B). Ambas as membranas foram mantidas sobre uma placa invertida de meio LB sólido com tetraciclina, e incubadas à 37°C , por 18 hs, para crescimento bacteriano. Após este período, a membrana B foi retirada cuidadosamente,

incubada com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase, e em seguida com um anticorpo secundário complexado com fosfatase alcalina, e, finalmente revelada com NBT/BCIP. A toxina Neuwiedase foi utilizada como controle positivo. Os controles negativos foram feitos com Soroalbumina bovina e colônias de ER2738 não infectadas com fagos. Um esquema representando este processo é mostrado na figura 4.

Nesta técnica as colônias bacterianas produtoras de fagos são fisicamente separadas dos bacteriófagos, através da membrana A que possui poros de 0,45 μ m, por onde as bactérias não são capazes de passar devido ao tamanho destas e os fagos podem percorrer livremente. Assim, os fagos migram pelos poros da membrana A e são capturados pelas cargas da membrana B, onde permanecem isolados.

2.7. Extração e sequenciamento de DNA

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriunda do 3º ciclo de “Biopanning” foram transferidas para microtubos de 2ml, contendo 1ml de meio LB líquido com tetraciclina; a cada tubo foi adicionada apenas uma colônia. Os tubos foram incubados a 37°C por seis horas, sob vigorosa agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, a 4°C, durante 30 segundos; o sobrenadante transferido para um novo tubo e recentrifugado. Apenas 80% do sobrenadante resultante da segunda centrifugação foi transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos, com 200 μ l de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução autoclavada). Após o período de incubação os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 μ l de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foi adicionado ao precipitado de fagos.

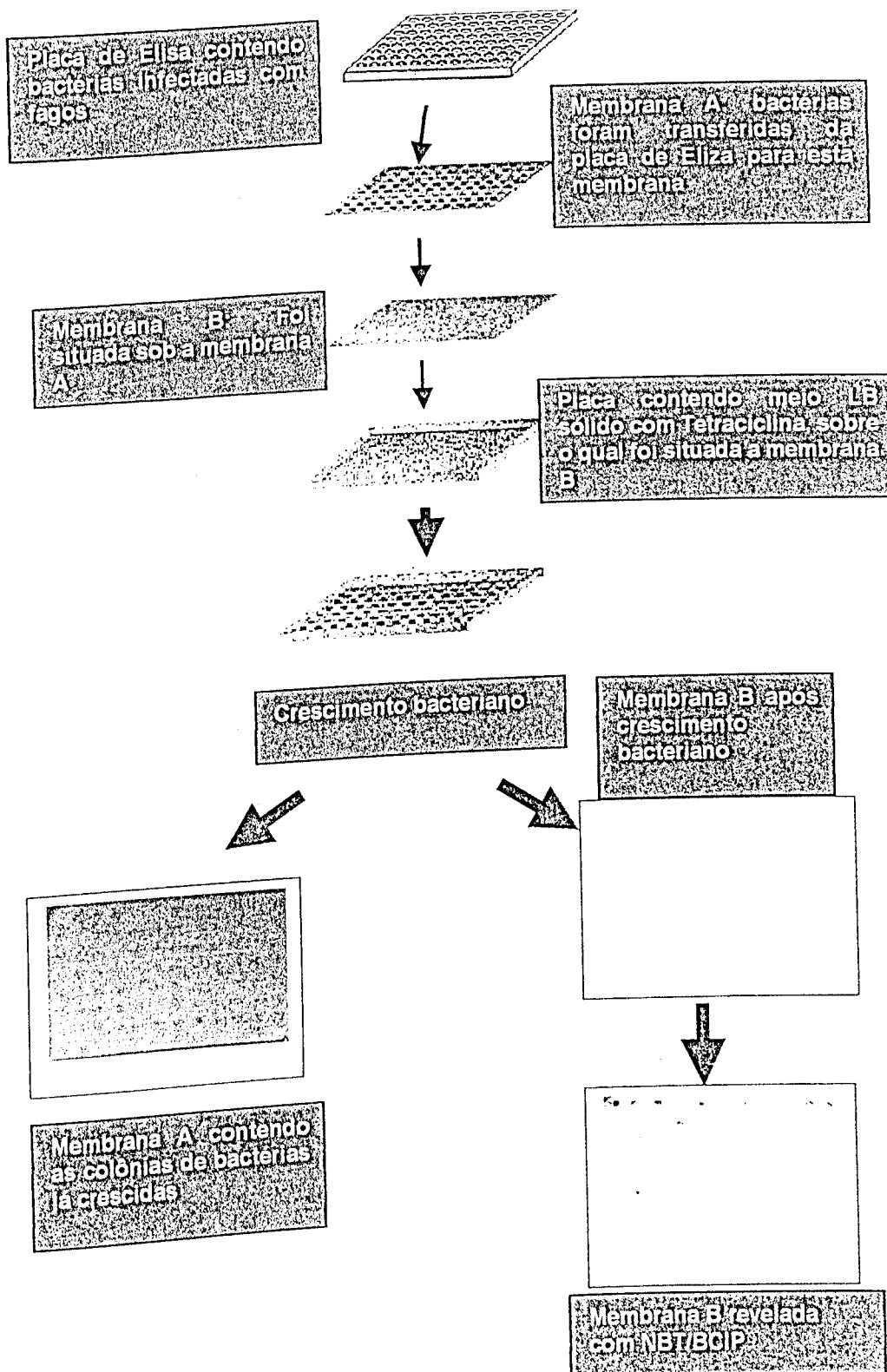


Figura 4- Esquema representativo do “Colony Blotting”.

Os tubos foram agitados vigorosamente e em seguida, 250 μ l de Etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado de fagos foi lavado com 500 μ l de Etanol 70% e recentrifugado. Finalmente o precipitado remanescente foi diluído em 10 μ l de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de Agarose 1%.

Na reação de seqüenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do primer -96 gIII (5'-³²P CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. -Amersham Biosciences). A reação de 30 ciclos foi realizada em um Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: Desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do primer (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1 μ l de Acetato de Amônio e Etanol, homogeneizando a placa com leves batimentos. Então foram acrescentados 27,5 μ l de Etanol absoluto, em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150 μ l de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 minutos, a 4000 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio e assim ficou durante cinco minutos para evaporar o Etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos no tampão de diluição (DYEEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. -Amersham Bioscieces).

A leitura do seqüenciamento foi realizada por um seqüenciador automático "MegaBace" (Amershan Biosciences), no laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

2.8. Análise de dados por Bioinformática.

Foram utilizados diferentes protocolos de análises de dados: DNA2PRO12 - para traduzir as seqüências de DNA obtidas no sequenciamento. O programa de análise de alinhamento MATCH foi solicitado para alinhar o conjunto dos clones seqüenciados, assim como cada clone individual com a estrutura primária da Neu. Os programas acima citados estão disponíveis no "site" www.relic.bio.anl.gov. As seqüências consenso obtidas entre os alinhamentos da Neu com os peptídeos sintéticos foram analisadas utilizando o BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool), um conjunto de programas que buscam similaridades entre seqüências e são designados para comparar (alinhar) as seqüências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucléicos e proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Assim, estes consensos foram submetidos ao alinhamento com outras metaloproteinases de serpentes do gênero *Bothrops*.

As regiões antigênicas da Neu foram previstas pelo software DNASTAR, o qual baseou-se no índice antigênico de Jamesson-Wolf. As posições de alinhamentos das seqüências peptídicas dentro destas regiões foram avaliadas. O índice antigênico de Jamesson-Wolf utiliza a estrutura primária da proteína para analisar os valores combinados de hidrofilicidade, probabilidade de superfície, flexibilidade e previsão da estrutura secundária, e então supor as regiões antigênicas.

3. RESULTADOS

3.1. “Biopanning” e titulações

Durante 3 ciclos consecutivos de “Biopanning”, todas as colônias presentes nas placas de titulação apresentaram coloração azulada (figura 5), indicando a quebra do substrato X-Gal, que mostra a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos, pelas bactérias ER2738.

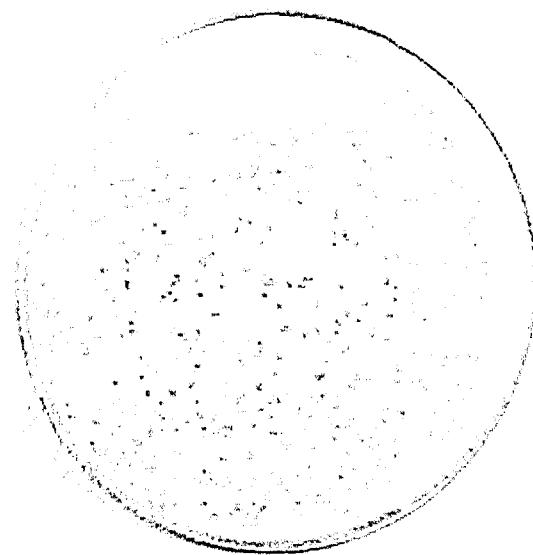


Figura 5: Colônias azuis de *E. coli* ER2738 infectadas com fagos M13, os quais carreiam o gene β -galactosidase. A mistura de bactérias com fagos foi plaqueada com Agarose Top sobre o meio LB, contendo IPTG/X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Dgalactopyranosideo).

A quantidade de fagos das titulações e amplificações em todos os ciclos de “Biopanning” é mostrada na Tabela 1. Os títulos de entrada dos fagos no “Biopanning” são sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação paratopo/mimetopo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade

ao anticorpo são lavados (removidos). Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência deste processo.

Tabela-1 Títulos de fagos obtidos durante os 3 processos de biopanning.

Etapa	Número de partículas de fagos por 10 μ l	
	Pré-seleção	Pós-seleção
1º ciclo de "Biopanning"	$4,0 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^2$
Amplificação do 1º ciclo	$1,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^{11}$
2º ciclo de "Biopanning"	$2,0 \times 10^{11}$	$7,9 \times 10^5$
Amplificação do 2º ciclo	$7,9 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{10}$
3º ciclo de "Biopanning"	$2,0 \times 10^{11}$	$9,0 \times 10^6$

A quantidade de fagos que entra ou sai em todos os ciclos é mostrada.

3.2. Eletroforese dos três ciclos de seleção por afinidade

A eletroforese sob condições redutoras dos eluatos dos 3 ciclos de "Biopanning" foi realizada para verificar a presença de bandas que representam as principais proteínas do capsídeo viral. Todas as amostras apresentavam a mesma quantidade de partículas virais (1×10^{10} partículas), as proteínas pIII (carreadora do peptídeo sintético) e pVIII (mais numerosa proteína do capsídeo) são visualizadas na figura 6.

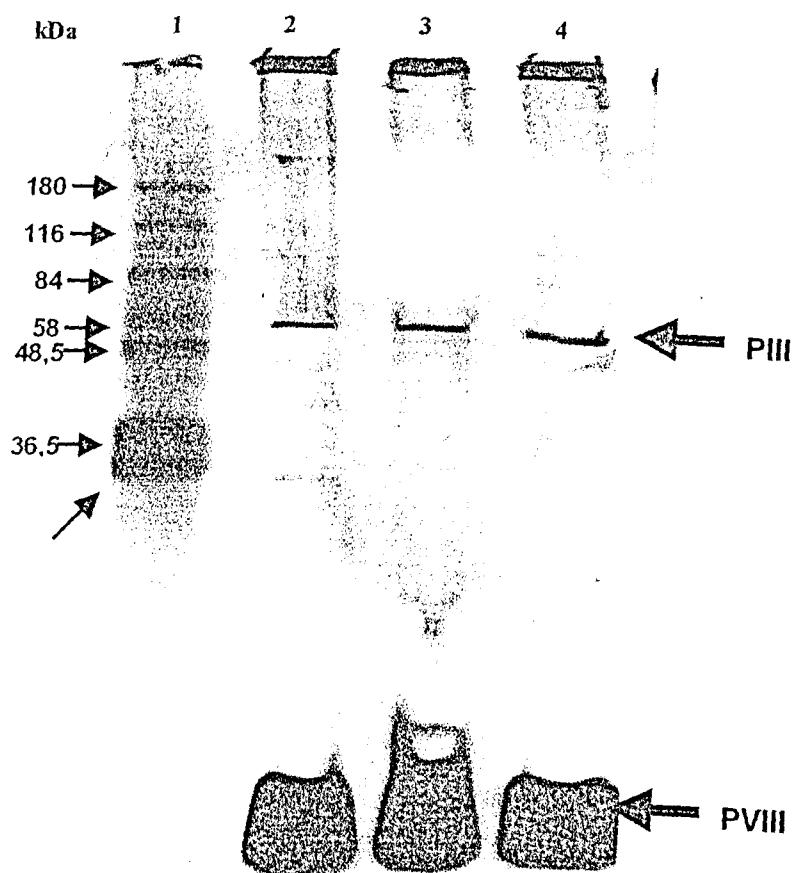


Figura 6- Eletroforese de amostras amplificadas dos três ciclos de "Biopanning" em gel de poliacrilamida a 16% com SDS. Tampão tris-tricina. Tempo de corrida 300 minutos a 10 mA constante e voltagem variando de 100 a 120 V. Após a corrida o gel foi corado com prata. 1 - Marcador de peso molecular. 2, 3 e 4 - 1×10^{10} partículas virais dos eluatos amplificados dos 1º, 2º e 3º ciclos de seleção por afinidade, respectivamente. As proteínas PIII e PVIII estão indicadas por setas.

3.3. "Western blotting" dos três ciclos de seleção por afinidade

A figura 7 mostra o resultado de um "Western Blotting" realizado com os fagos eluídos provenientes dos três ciclos de "Biopanning", mostrando o reconhecimento pelo anticorpo anti-Neuwiedase na região representativa da proteína pIII, a qual carreia o peptídeo sintético. A intensidade de marcação na membrana aumenta do primeiro para o terceiro ciclo de "Biopanning", sendo a quantidade de fagos idêntica em todas as amostras.

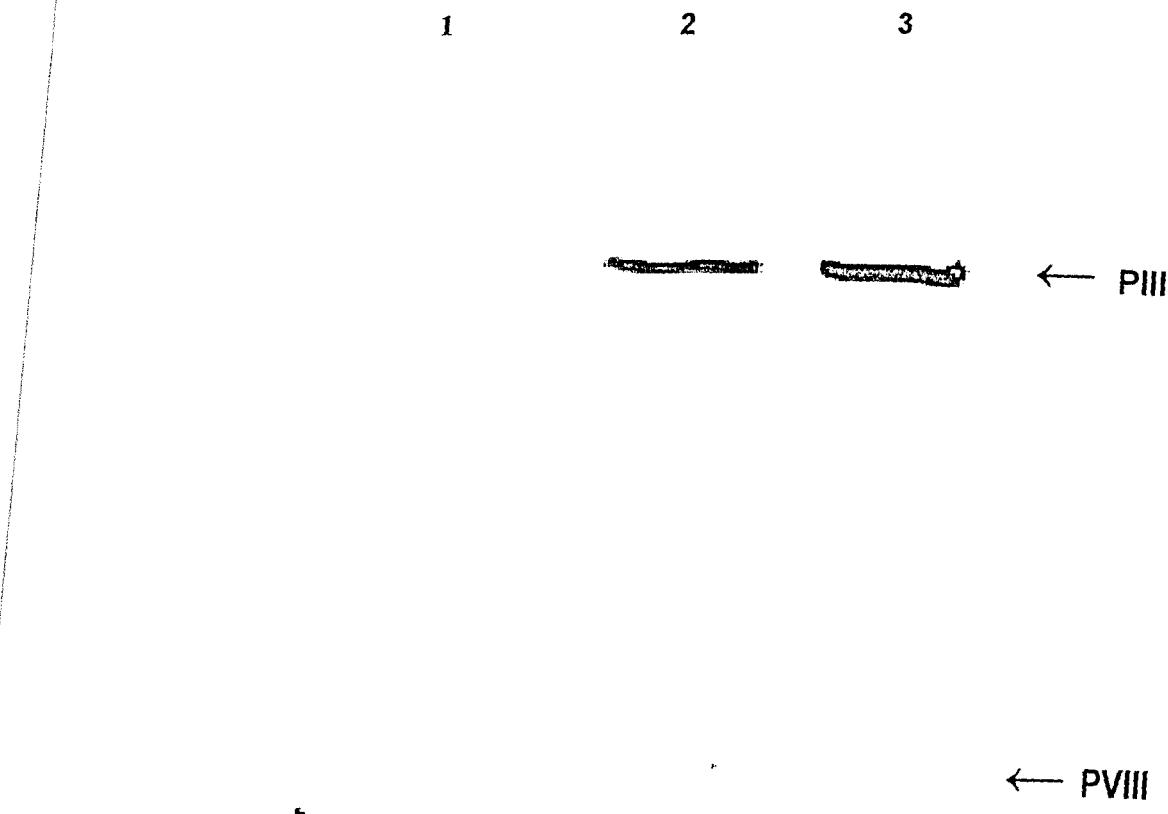


Figura 7 - Western blotting de um gel de poliacrilamida 16% com SDS corrido com fagos dos 1º, 2º e 3º ciclos (representados respectivamente pela numeração acima) de "Biopanning", onde foram utilizados anticorpos policlonais anti Neuwiedase. No gel foram aplicadas 1×10^{10} partículas virais para cada amostra. Os anticorpos anti-Neuwiedase foram utilizados como primário e o secundário estava complexado com fosfatase alcalina. A membrana foi revelada com NBT/ BCIP. As posições das proteínas pIII, PVIII estão indicados pelas setas.

3.4. "Colony blotting"

Após o isolamento de cada clone de fago tornou-se necessário identificar os fagos imunoreativos com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase, assim foi realizado um Colony Blotting, cujo resultado é mostrado na figura 9. Num total de 86 clones foram identificados 45 imunoreativos com os anticorpos policlonais, ou seja, 52,33% dos clones selecionados interagiram com os referidos anticorpos. A figura 8 mostra a membrana A após 18 horas de crescimento bacteriano, cada colônia estava infectada com um único clone de fago e todas elas cresceram bem isoladas.

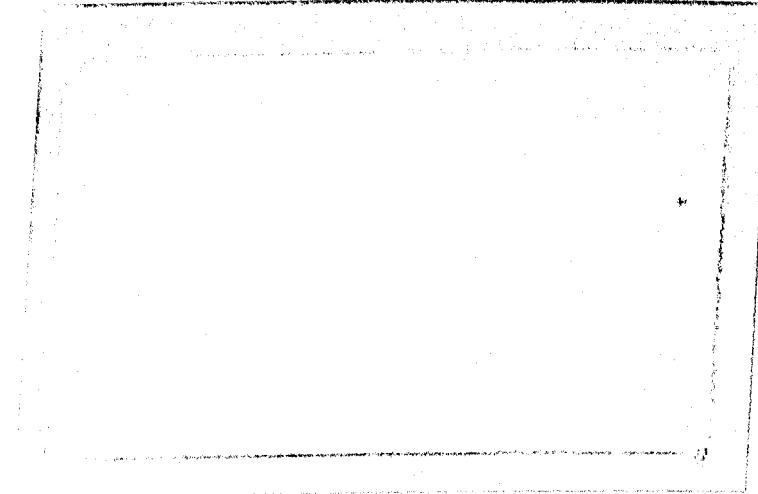


Figura 8- Colônias bacterianas crescidas sobre a Membrana A (Hybond ECL – Sigma, com poros de 0,45 µm) durante o "Colony blotting" dos fagos isolados em três ciclos de "Biopanning", pela interação com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase.

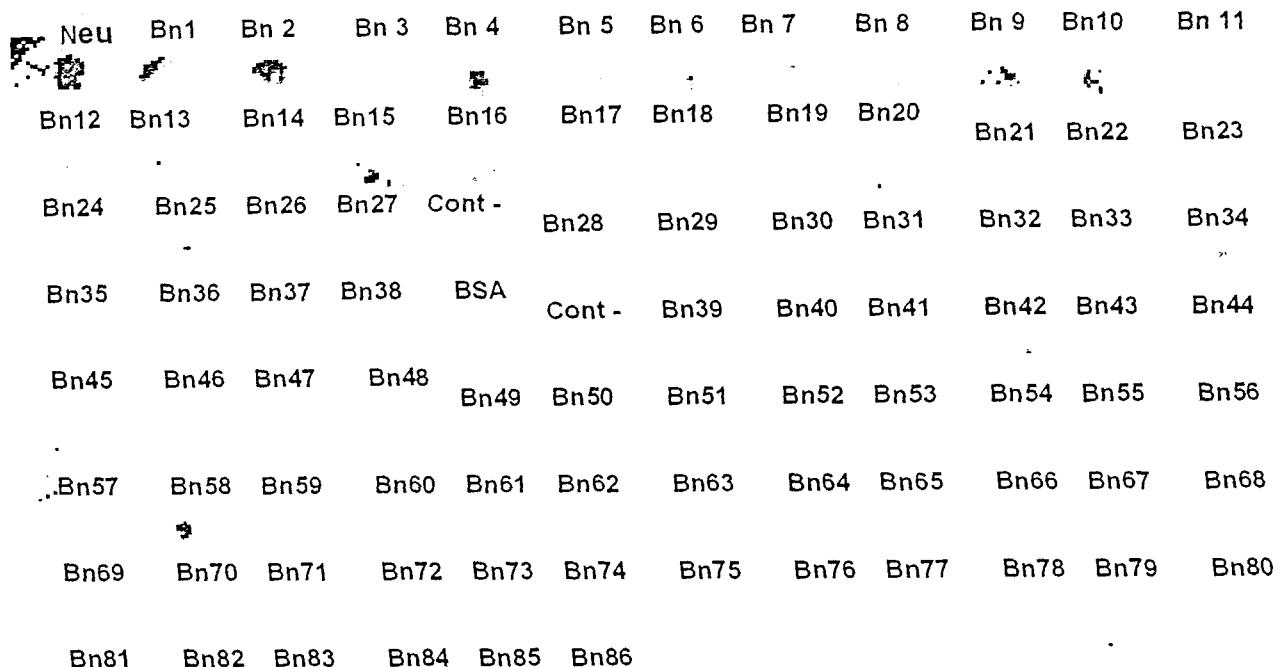


Figura 9- "Colony blotting" dos fagos isolados em três ciclos de "Biopanning", pela interação com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase. Após o crescimento bacteriano a membrana B, com poros de $0,22\mu\text{m}$ foi retirada cuidadosamente, incubada com anticorpos policlonais anti-Neuwiedase, e posteriormente com anticorpo secundário complexado com fosfatase alcalina; então foi revelada com NBT/BCIP. Os pontos escurecidos representam as posições das colônias infectadas com fagos que interagem especificamente com anticorpos anti-Neuwiedase, sobre cada ponto está a identificação do fago. Para controle positivo foi utilizada a Neuwiedase, representada acima por Neu. Os controles negativos (Cont -). foram feitos com Soroalbumina bovina (BSA) e colônias de ER2738 não infectadas com fagos.

3.5. Extração e seqüenciamento de DNA

Após a extração, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de Agarose 1%, onde foi estimada sua quantidade em 5 μ l. Isto foi realizado pela comparação da intensidade das bandas das amostras com a intensidade da banda do DNA padrão, o qual continha uma massa de 500ng. As quantidades estimadas dos DNAs extraídos foram próximas da quantidade do DNA padrão. Em seguida o DNA foi seqüenciado e traduzido. As estruturas de aminoácidos, assim como as freqüências de todos os clones de fagos seqüenciados estão mostradas na Tabela 2. Foram seqüenciados 53 clones, e destes, quatro ocorreram mais de uma vez.

3.6. Análise de dados por Bioinformática

Resíduos de Cisteína estavam ausentes nos peptídeos seqüenciados. Para o alinhamento entre a estrutura primária da Neu e as seqüências de aminoácidos de cada peptídeo sintético foi utilizado o programa MATCH. Na Tabela 3 estão representados os alinhamentos que possuem identidade com três ou mais aminoácidos, entre a Neu e o clone avaliado. O peptídeo Bn1 alinhou com seis aminoácidos da proteína, enquanto os Bn 24 e Bn36 alinharam com cinco, os peptídeos Bn16, Bn22, Bn24 e Bn13 alinharam com quatro e os Bn50, Bn33, Bn14 e Bn43 alinharam com apenas três aminoácidos.

O alinhamento entre a estrutura primária da Neu e o conjunto de todos os clones seqüenciados, presente na figura 10, foi realizado também com auxílio do programa MATCH. De um conjunto com 53 peptídeos sintéticos seqüenciados, apenas 10 alinharam com a estrutura primária da Neu, os alinhamentos ocorreram em cinco posições diferentes desta proteína: Foram observados três motivos de alinhamentos próximos à região N-terminal da Neu (1^a - entre os aminoácidos 4 e 13 da proteína; 2^a - entre os aminoácidos 21 e 33 da proteína e 3^a - entre os aminoácidos 39 e 51 da proteína); Outra posição de alinhamento foi identificada próxima à metade da estrutura primária da Neu (4^a - entre os aminoácidos 122 e 128). No sítio ativo da enzima foi encontrada uma 5^a posição

de alinhamento - entre os aminoácidos 148 e 153 da proteína. Estes alinhamentos podem ser observados na figura 10.

Tabela 2- Estrutura primária e imunorreatividade dos peptídeos sintéticos expressos na superfície de fagos filamentosos.

Clone	Seqüência de aminoácidos	Freqüência	Imunorreatividade
Bn 1	NNINQFFRSQPF	1/53	+
Bn 2, Bn 28	QIVDNGMFSHYH	2/53	+
Bn 3, Bn10, Bn19	NSLNQWMRNTLD	3/53	+
Bn 4	DHGLFTQHIMPD	1/53	+
Bn 5	NSISAYFANNPV	1/53	+
Bn 6, Bn 44	GTMADFIHADTV	2/53	+
Bn 7	HIAKPLSYNSHH	1/53	+
Bn 8, Bn 46	YTPLPNFWSFQA	2/53	+
Bn 9	GDHGMFTAAFVS	1/53	+
Bn 11	HAAAFAWHGMFS	1/53	+
Bn 12	EPILNNFLRNWP	1/53	+
Bn 13	MNLGMDDPRHRR	1/53	+
Bn 14	HKSFNSLNDFLR	1/53	+
Bn 15	EYPAFKGLSLER	1/53	+
Bn 16	KDFSHTYIQLAN	1/53	+
Bn 17	TYHGMFTLFRDT	1/53	+
Bn 18	QLNEWFRPPSMR	1/53	+
Bn 20	DHGSFTGASSPN	1/53	+
Bn 21	DLRNHGMFSGVT	1/53	+
Bn 22	TQETFTKYNLHA	1/53	+
Bn 23	ATPTSAARPSLG	1/53	-
Bn 24	NSLSNHFRSQHS	1/53	+
Bn 25	NMNNFLRSFTPS	1/53	+
Bn 26	TNINSFLRTTYA	1/53	+
Bn27	VFSNSLDEFMYW	1/53	-
Bn 29	IMTDHKRGVVSM	1/53	+
Bn30	NTLDYYFHMTSS	1/53	-
Bn 31	NALDEYFTKPSL	1/53	-
Bn 32	WDQFTRPSLPTS	1/53	-
Bn 33	SLNNWFRLTPAP	1/53	+
Bn 34	TLNKYIRDSSLTT	1/53	+
Bn 35	SSPTYNLTNTMFR	1/53	+
Bn 36	TTLNSFMRSPFP	1/53	+
Bn 37	HAAYASLNLYLR	1/53	+
Bn 38	NTGHGMFSTSSL	1/53	+
Bn39	APDGFWLNTWIR	1/53	-
Bn 40	GHDHSYWLSPPT	1/53	-
Bn 41	TWVPHGMFTTFP	1/53	-
Bn 42	NHSHNSLALHFS	1/53	-
Bn 43	NLNQHIRSLSIP	1/53	+
Bn 45	SNLMNEWFRYSP	1/53	+
Bn 47	NYSSLYWHFRAL	1/53	+
Bn 48	VNPANSLQQWFI	1/53	-
Bn 49	GSPTDQLHVKNR	1/53	-
Bn 50	HANLNGWLRTLS	1/53	+
Bn 51	TLNEWLRPNSHS	1/53	-
Bn 52	DTPTTQRPLHAR	1/53	-
Bn 58	FPPQHGMFSSSP	1/53	+

As seqüências inimunorreativas determinadas por "Colony blotting" com os anticorpos policlonais anti-Neuwiedase são indicadas por (+) e as não reativas por (-). A freqüência de cada peptídeo está representada.

As regiões antigenicas da Neu foram previstas pelo programa DNASTAR, que determinou as posições mais antigenicas desta proteína e mostrou 10 motivos antigenicos principais (figura 10).

A maioria dos alinhamentos ocorreu fora das regiões antigenicas previstas, apenas os clones Bn 22 (TQETFTKYNLHA) alinhou completamente dentro de uma destas regiões.

Tabela 3- Alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos da Neu e dos peptídeos sintéticos expressos em fagos.

Clone		Seqüências alinhadas	Consenso (Neu x clone)
Bn 16	Neu Clone	3 RFPQRYTET 12 kda[shth]qalan	FXXXXYXL
Bn 22	Neu Clone	17 DRRMYT[RE]ND 27 tqetf[RE]alha	TKYN
Bn 24	Neu Clone	25 NSDSNKE[TR] 34 ns1sphf[RE]sqhs	NSXSNXXR
Bn 24	Neu Clone	40 NTVNGF[RE]SMNVD 52 ps1snh[RE]sqhs	NXXXXXFRS
Bn 1	Neu Clone	40 NTVNGF[RE]SMNVD 52 mning[RE]sqpf	NXXNNEFRS
Bn 36	Neu Clone	40 NTVNGF[RE]SMNVD 52 t[RE]lsm[RE]fpp	TXNFXRS
Bn 50	Neu Clone	39 VNTVNGF[RE]SMN 50 han[RE]gwlts	NGXXR
Bn 33	Neu Clone	40 NTVNGF[RE]SMNVD 52 s1nw[RE]ltpp	NXXFR
Bn 14	Neu Clone	40 NTVNGF[RE]SMNVDASL 55 hks[RE]ns1ndflr	FXSXN
Bn 43	Neu Clone	117 SMCPKRSVGIV 128 nlngqhi[RE]lsrp	RSXXI
Bn 13	Neu Clone	147 GH[RE]GMEHDGRD 158 m[RE]ddprhrr	NLGM

Estão representadas as regiões onde ocorrem os alinhamentos (em vermelho) e as seqüências consenso (coluna direita). O programa de alinhamento utilizado foi o MATCH.

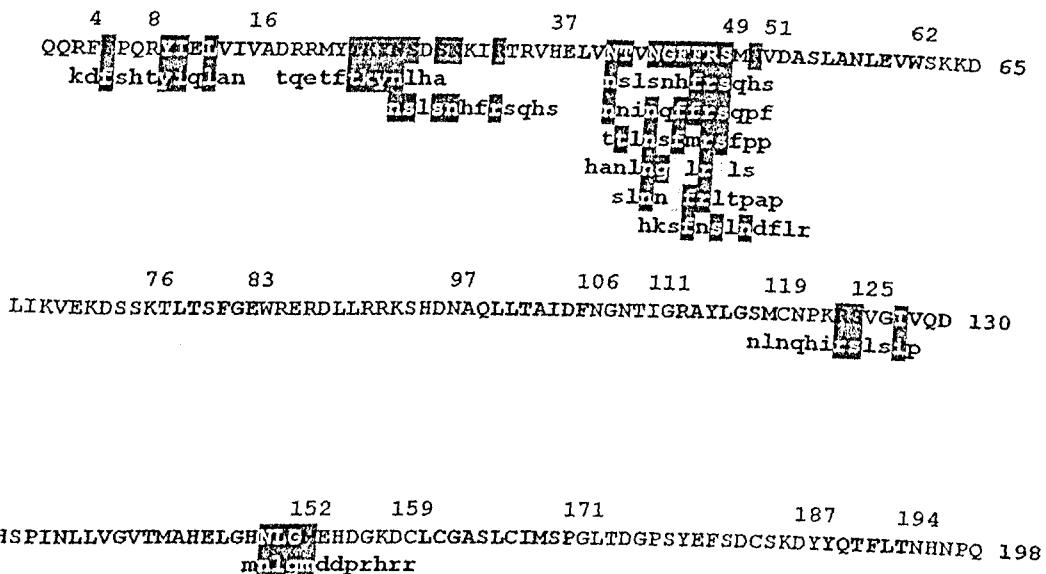


Figura 10- Representação dos alinhamentos entre as seqüências de 10 peptídeos sintéticos e a Neu. As regiões antigenicas previstas pelo software DNASTAR, baseada no índice antigenico de Jamesson-Wolf, são mostradas em azul. Em vermelho estão os aminoácidos que alinharam. Os números indicam as posições dos aminoácidos na estrutura primária da Neuwiedase.

Através de alinhamento dos motivos consenso entre Neu e clone com outras metaloproteinases do gênero *Bothrops* (descritas no Gen Bank) foram constatadas similaridades da seqüência **NLGM** (correspondente ao alinhamento da Neu com o clone Bn13) e as metaloproteinases BOJUMET I, II, III da serpente *Bothrops jararacussu*, e também com a berythreactivase de *Bothrops erythromelas* (SILVA, 2003). A metaloproteinase Bap1 do veneno *Bothrops Asper* mostrou similaridade com os motivos **NXXNXFFRS** e **TKYN**, os quais são provenientes dos alinhamentos da Neu com os clones Bn1 e Bn22, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4- Alinhamento dos motivos consenso Neu x clone com metaloproteínases de peçonhas de serpentes Botropicas descritas no Gene Bank

Seqüência consenso/ clone	Metalo	Origem	Alinhamento	Score
NLGM Bn13	BOJUMET I	<i>Bothrops jararacussu</i>	Consenso 1 NLGM 4 Metallo 300 NLGM 303	15.2
NLGM Bn13	BOJUMET II	<i>Bothrops jararacussu</i>	Cons 1 NLGM 4 Metallo 57 NLGM 60	15.2
NLGM Bn13	BOJUMET III	<i>Bothrops jararacussu</i>	Cons 1 NLGM 4 Metallo 105 NLGM 108	15.2
NLGM Bn13	Berythreactivase	<i>Bothrops erythromelas</i>	Cons 1 NLGM 4 Metal 341 NLGM 344	15.2
NXXNXFFRS Bn1	Bapl	<i>Bothrops Asper</i>	Cons 4 NXFFRS 9 Metallo 41 NGFYRS 46	15.1
TKYN Bn22	Bapl	<i>Bothrops Asper</i>	Cons 1 TKYN 4 Metallo 20 TKYN 23	14.8

Foi utilizado o programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast). Os alinhamentos estão mostrados entre o consenso Neu x Clone (cons) e a metaloproteína (metalo).

O motivo TKYN é conservado nas metaloproteínases não hemorrágicas LHF-II, fibrolase e lebetase da peçonha da serpente *Lachesis muta muta* e ACLPREF de *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Outras metaloproteínases não hemorrágicas, tais como Adamalysin-II de *Crotalus adamanteus*, possuem o domínio conservado KYN que aparece neste peptídeo. As mesmas toxinas citadas aqui mostraram similaridades estruturais com o motivo consenso NLGM localizado no sitio ativo da Neu e presente no clone Bn13 (RODRIGUES, V.M., 2000).

4. DISCUSSÃO

Durante os ciclos de “Biopanning” para seleção dos peptídeos de interesse, todas as bactérias submetidas a infecção com bacteriófagos selecionados, quando crescidas em meio LB sólido contendo IPTG/X-GAL, desenvolveram colônias de coloração azulada, indicando a expressão do gene *lac Z*. Evidenciou-se desta forma, ausência de bactérias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (não carreadores do gene *Lac Z*) (BARBAS, 2001). Os títulos dos fagos na entrada do “Biopanning” são sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficam ligados a estes pela interação com o paratopo, e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos são lavados (removidos). Fagos com baixa afinidade pelos anticorpos podem ficar aderidos diretamente à placa, não interagindo com os anticorpos, ou ainda permanecerem suspensos na solução (não ligados), assim quando a solução de TBST 0,05% é adicionada e, logo depois, removida, muitos destes fagos não específicos são excluídos. Isto leva a redução nos títulos após as etapas de “Biopanning”. Além disto fagos ligados aos anticorpos também podem ser removidos e excluídos. Ao contrário do “Biopanning”, os títulos de fagos após cada processo de amplificação foram maiores que os títulos não amplificados; isto prova a eficiência deste processo.

A figura 6 mostra um gel de poliacrilamida onde foram corridas amostras dos eluatos dos três ciclos de “Biopanning”. A massa molecular da PIII é 42,5 KDa, contudo, sua massa molecular no gel de SDS variou de 48,5 a 58 Kda; este aumento aparente de massa molecular é provavelmente devido as regiões espaçadoras, ricas em Glicina, que ocorrem entre os domínios da PIII e, também devido a presença do peptídeo sintético. Estes dados concordam com os achados de Van Wezenbeek et al. (1980). Além disto, o uso de agentes desnaturantes (DTT e SDS) torna a molécula linear, o que dificulta sua passagem na malha de poliacrilamida do gel.

A presença das proteínas pIII e PVIII no gel foram evidentes, o que possibilitou a realização do ensaio de “Western blotting” onde foi constatada imunorreatividade apenas nas posições representativas da pIII (figura 7). Este resultado mostrou a possível interação dos anticorpos anti-Neuwiedase com os

peptídeos sintéticos presentes nas proteínas pIII, e excluiu a possibilidade da interação dos anticorpos com outras proteínas do capsídeo viral. Além disto, a quantidade de fagos em todas as amostras foi idêntica (1×10^{10} partículas virais); já a marcação da pIII na membrana foi diferenciada, com intensidade crescente do 1º para o 3º ciclo de "Biopanning". A quantidade de pIII nas três amostras não variou, mas a intensidade de imunorreatividade presente na posição relativa a esta proteína variou, indicando que os peptídeos sintéticos presentes também nesta posição foram os responsáveis pela variação na intensidade da imunorreatividade observada nos três ciclos de "Biopanning". Esta variação na intensidade prova que no decorrer do "Biopanning" houve aumento na população de fagos carreadores de peptídeos sintéticos antigênicos aos anticorpos policlonais anti-NeuWiedase.

No teste de "Colony blotting" para determinar os clones imunorreativos, verificou-se uma grande proporção (52,33%) de positivos, contudo deve ser ressaltado o fato de que os anticorpos utilizados para selecionar estes clones não foram purificados por afinidade e são oriundos de soro policlonal, assim, os anticorpos presentes poderiam estar associados com muitos diferentes alvos além da Neu, resultando em uma certa proporção de falso positivo. Contudo a Neu possui uma estrutura constituída por 198 aminoácidos, podendo expor vários epítopos. A maioria dos autores utiliza para o "Biopanning" anticorpos monoclonais e purificados por afinidade, isto facilita o isolamento de uma seqüência consenso bem definida (GAZARIAN, 2000; DEMANGEL, 2000; CUI, 2003; VANHOORELBEKE, 2003).

Na população de peptídeos seqüenciados foi observada a ausência de resíduos de Cisteína; uma causa provável é a interferência no processo infectivo do fago na bactéria, pois, de acordo com Rodi (2002), resíduos de Cisteína não pareados (sem formar ponte dissulfeto) presentes no peptídeo sintético podem formar pontes dissulfeto com os quatro resíduos de Cisteína localizados no domínio D1 da pIII, e desta forma diminuir a infectividade do fago. Assim, peptídeos com Cisteína são menos freqüentes na população selecionada, fato este que compromete o mapeamento de epítopos e isolamento de mimetótopos de proteínas ricas em Cisteína, o que não ocorre com a Neu.

Dos peptídeos seqüenciados 10 apresentaram similaridades estruturais com a Neu. Estes peptídeos foram imunorreativos por "Colony Blotting" indicando uma ação antigênica frente a anticorpos policlonais anti-Neuriedase. Diferentes intensidades de alinhamentos foram observadas, ou seja, um peptídeo possui seis aminoácidos homólogos com a Neu, dois peptídeos apresentaram similaridades de cinco aminoácidos com a Neu, e dois grupos contendo quatro peptídeos cada mostraram similaridades de três e de quatro aminoácidos com a Neu. Apesar de alguns destes peptídeos apresentarem poucos aminoácidos homólogos com a Neu, eles podem interagir com grande afinidade e fortemente com paratopos de anticorpos anti-Neuriedase. Irving et al. (2001) relataram que em casos de baixa similaridade estrutural podem ocorrer contatos realizados via redes de ligações diferentes das realizadas entre o paratopo com o epítopo nativo. Desta forma, a interação entre o peptídeo sintético e o epítopo pode ocorrer sem necessidade de identidade estrutural. Mesmo sem ter alinhado com a estrutura primária da Neu, alguns peptídeos poderiam apresentar imunogenicidade para estimular a produção de anticorpos capazes de interagir com a Neu, neste caso eles seriam considerados mimetopos.

Ainda, Liu et al. (2003) relataram que mimetopos sem similaridades estruturais com o epítopo nativo, geralmente são isolados durante o "Biopanning" por anticorpos que possuem epítópos nativos descontínuos, assim, muitos daqueles clones imunorreativos que não apresentaram similaridades estruturais com a Neu, encontrados neste trabalho, podem ser mimetopos de epítópos conformacionais presentes na toxina nativa.

As seqüências dos peptídeos sintéticos selecionados foram alinhadas com a estrutura primária da Neu, e a maioria dos motivos da Neu onde ocorreram estes alinhamentos não fazem parte das regiões antigênicas previstas pelo software DNASTAR. PÁL (2003) identificou o epítopo de um anticorpo monoclonal anti proteína X do vírus da hepatite B e, constatou a contradição no índice antigênico de James-Wolf, o qual supôs a região do epítopo como portadora de baixa antigenicidade. Ferreira-da-Cruz et al. (1996) determinaram as regiões antigênicas previstas da proteína p-126 de *Plasmodium falciparum* através de dois softwares distintos, e baseados na composição de aminoácidos destas regiões previstas foram gerados peptídeos sintéticos, os quais foram submetidos

a um teste de ELISA, realizado com soro de pacientes portadores de malária; no entanto, os autores observaram que este método não foi eficiente para encontrar as regiões antigênicas da p-126, pois apresentou baixa probabilidade de acerto (apenas 45%). Apesar destes programas de Bioinformática serem constantemente solicitados nas previsões estruturais, propriedades físico-químicas e imunológicas de proteínas desconhecidas, eles podem apresentar falhas, pois suas bases para análises são apenas as estruturas primárias das proteínas. Desta forma, justificam-se os poucos alinhamentos ocorridos em regiões antigênicas previstas, por computador, da Neu e as seqüências de peptídeos sintéticos selecionados por imunoafinidade.

Dados de publicações têm mostrado que peptídeos sintéticos em fagos podem ser utilizados para mapear epítopos lineares (JELLIS et al., 1993; STEPHEN et al., 1995; WILLIAMS et al., 1998), assim como epítopos conformacionais e suas partes lineares (FELICI, 1993; LUZZAGO, 1993; CHIRINOS-ROJAS, 1999; CUI, 2003; RIEMER, 2004), contudo, em alguns casos não foram observadas similaridades estruturais suficientes para mapear os epítopos (ORLANDI, 1997; RAVERA, 1998). O presente estudo levou à identificação de um suposto epítopo na Neu. Um grupo de seis peptídeos apresentaram aminoácidos homólogos com esta região (figura 10), a qual corresponde à seqüência posicionada entre os aminoácidos 39 e 49 da Neu. Alguns autores utilizam o modelo molecular da proteína para alinhar os clones em sua estrutura tridimensional (DEMANGEL, 2000; HERNANDEZ, 2002; MANIHAL, 2004; RIEMER, 2004), isto torna possível analisar o posicionamento do provável epítopo na estrutura terciária, pois na maioria das proteínas, os epítopos ocorrem em regiões flexíveis e protuberâncias na superfície da molécula (GETZOFF, 1987). Assim, fica sugerida a possibilidade da seqüência 40NTVNGFFRSMN48 ser um epítopo da Neu. Alguns peptídeos alinharam sem formar grupos, possivelmente devido a quantidade de clones seqüenciados ser insuficiente para elucidar os epítopos, pois anticorpos policlonais geralmente possuem vários epítopos, a quantidade de seqüências exigidas na identificação destes é maior quando comparada com epítopos de anticorpos monoclonais (BARBAS, 2001). Apesar disto, estes peptídeos apresentam-se como potenciais mimetótopos da Neu.

A técnica "Phage display" vem sendo empregada no isolamento de peptídeos sintéticos utilizados como imunógenos para obter anticorpos que neutralizam efeitos tóxicos de componentes de venenos animais e toxinas bacterianas (KASHER, 2001; WU, 2001; HERNANDEZ, 2002). Ao mesmo tempo, considerando-se a grande similaridade estrutural entre as diferentes metaloproteinases de peçonhas ofídicas, anticorpos antitoxinas são capazes de neutralizar toxinas homólogas de outras peçonhas (HARRISON, 2003), então pode-se afirmar que os peptídeos sintéticos Bn22 e Bn13 carreadores das seqüências TKIN e NLGM, respectivamente, apresentam-se como potenciais imunógenos na produção de anticorpos neutralizantes das ações tóxicas observadas com as metaloproteínases pouco hemorrágicas LHF-II, fibrolase, lebetase, ACLPREF, Adamalysina-II, Atroxase, Atrolynsina-C e Ht-b, pois todas estas toxinas possuem as seqüências conservadas KIN e NLGM (RODRIGUES, 2000). O consenso NLGM também pode ser encontrado nas metaloproteinases botrópicas hemorrágicas BOJUMET I, BOJUMET II e BOJUMET III, e na toxina ativadora de protrombina denominada Berythractivase (SILVA et al., 2003), este consenso está localizado nos sítios ativos das metaloproteinases. Desta forma, o peptídeo portador do consenso NLGM, caso seja imunogênico, poderia induzir a produção de anticorpos capazes de neutralizar a atividade catalítica destas enzmas, responsável por sua toxicidade. A metaloproteína hemorrágica Bap1 da peçonha de *Bothrops asper*, apresentou similaridades estruturais com as seqüências consenso TKIN e NXXFRS presentes nos clones Bn22 e Bn1, respectivamente, indicando a presença de prováveis epítópos comuns às toxinas Neu e Bap 1, e desta forma originando a possibilidade de neutralizar hemorragia provocada pela Bap 1 com o uso de anticorpos produzidos através da imunização com estes peptídeos sintéticos.

5. CONCLUSÃO

A metodologia de seleção de peptídeos em "Phage display" foi utilizada com sucesso, permitindo a obtenção de 48 seqüências peptídicas, das quais 40 são antigênicas com anticorpos policlonais anti-Neuroidase.

Foram encontradas seqüências peptídicas com ou sem similaridades estruturais com a Neu, apresentando imunorreatividade com anticorpos anti-Neuroidase. As imunogenicidades destas seqüências devem ser avaliadas, buscando mimetótopos capazes de estimular a produção de anticorpos neutralizantes desta e de outras toxinas presentes em peçonhas.

A maioria dos peptídeos alinhou fora das regiões imunogênicas previstas no índice antigênico de Jamesson-Wolf, sugerindo assim, que as previsões realizadas para esta proteína poderiam não estar de acordo com a realidade, pois este programa parte da estrutura primária para realizar suas análises.

O alinhamento de seis peptídeos sintéticos no sítio 40NTVNGFFRSMN51 da Neu apontou este domínio como um provável epítopo. Outras análises futuras, tais como estudo destes alinhamentos na estrutura tridimensional da Neu e a avaliação das propriedades imunogênicas dos peptídeos que participam deste alinhamento são importantes para corroborar com esta hipótese.

No mapeamento de todos os epítopos da Neu torna-se necessário seqüenciar novos clones, pois as seqüências obtidas foram insuficientes para identificar a diversidade de epítopos dos anticorpos policlonais anti-Neuroidase.

Os peptídeos Bn1, Bn22 e Bn13 podem apresentar um grande potencial terapêutico, uma vez que os mesmos possuem seqüências comuns com várias toxinas metaloproteinases, componentes de peçonhas ofídicas. No caso de detectada antigenicidade favorecendo a produção de anticorpos neutralizantes de efeitos tóxicos observados com estas metaloproteinases, estes peptídeos poderiam ser utilizados como antígenos vacinais ou na produção de soro antiofídico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDA C. G.; ANDERS R. F.; TILLEY L.; FOLEY M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. **Comb. Chem. High Throughput. Screen.** v.5, p.1-14, 2002.
- BARBAS, C. F., BURTON, D. R., SCOTT, S. J. G. **Phage Display a Laboratory Manual.** 2001.
- CUI X.; HADYA N. S.; HOLMESA, I. H. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display. **Journal of Virological Methods.** v.114, p.109-112, 2003.
- AZZAZY H. M.; HIGHSMITH JR. W. E.; Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin. Biochem.** v.35, p.425-445, 2002.
- BJARNASON J.B.; FOX J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 352-372, 1994.
- CHIRINOS-ROJAS C. L.; STEWARD M. W.; PARTIDOS C. D. A. phage displayed mimotope inhibits tumour factor-alpha-induced cytotoxicity more effectively than the free mimotope. **Immunology.** v.96 (1), p.109-113, 1999.
- DEMANGEL C.; MAROUN C. R.; ROUYRE S.; BON C.; MAZIÉ J. C.; CHOUMET V. Combining phage and molecular modeling to map the epitope of a neutralizing antitoxin antibody. **Eur. J. Biochem.** v. 267, p. 2345-2353, 2000.
- FELICI F.; LUZZAGO A.; FOLGORI A.; CORTESE R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. **Gene.** v.128, p.21-27, 1993.

FERREIRA-DA-CRUZ M. F.; GIOVANI-DE-SIMONE S.; BANIC D. M.; CANTO-CAVALHEIRO M.; CAMUS D.; DANIEL-RIBEIRO C. T. Can Software be Used to Predict Antigenic Regions in *Plasmodium falciparum* Peptides? **Parasite Immunology**. v.18, p.156-161, 1996.

GAZARIAN T.; SELISKO B.; HÉRION P.; GAZARIAN K. Isolation and characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **Molecular Immunology**. v. 37, p. 755-766, 2000.

GETZOFF E. D.; GEYSEN H. M.; RODDA S. J.; ALEXANDER H.; TAINER J. A.; LERNER R. A. Mechanisms of antibody binding to a protein. **Science**, v.235, p.1191-1196, 1987.

HARRISON R. A.; WUSTERB W.; THEAKSTON R.D.G. The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody Theakstona. **Toxicon**. v.41, p-441-449, 2003.

HERNANDÉZ R.; GAZARIAN G.T.; HÉRION S. H.; GAZARIAN, G. K. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. **Immunology Letters**. v.80, p97-103, 2002.

HOOPER, N. M. Families of zinc metaloproteases. **FEBS Letters**. v.354, p.1-6, 1994.

IRVING M. B.; PAN O.; SCOTT J. K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.314-324, 2001.

JELLIS C.L.; CRADICK T.J.; RENNERT P. Defining critical residues in the epitope for HIV-neutralizing monoclonal antibodies using phage display and peptide array technologies. **Gene**. v.137, p.63-68, 1993.

KASHER R.; BALASS M.; SCHERF T.; FRIDKIN M.; FUCHS S.; KATCHALSKI-KATZIR E. Design and synthesis of peptides that bind K-bungarotoxin with high affinity. **Chemistry & Biology**. v.8, p.147-155, 2001.

LIU R.; ENSTROM A. M.; LAM K. S. Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. **Experimental Hematology**. v.31, p.11-30, 2003.

LUZZAGO A.; FELICI F.; TRAMONTANO A.; PESSI A.; CORTESE R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. **Gene**. v.128, p.51-57, 1993.

MANILAL S.; RANDLES K. N; AUNAC C.; MAN N. T. MORRIS G. E. A lamin A/C beta-strand containing the site of lipodystrophy mutations is a major surface epitope for a new panel of monoclonal antibodies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2004. (Artigo não impresso)

ORLANDI R.; FORMANTICI C.; MENARD S.; BOYER C.M.; WIENER J.R.; COLNAGI M. A linear region of a monoclonal antibody conformational epitope mapped on p185HER2 oncoprotein. **Biol Chem**. v.378 (11), p.1387-1392, 1997.

PÁL J.; CZÖMPÖLY T.; NYÁRÁDY Z.; MARCZINOVITS I.; JANÁKY T.; KELE Z.; FELICI F.; NÉMETH P. Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal antibody using microanalytical and molecular biological methods. **Molecular Immunology**. v. 40, p.241-246, 2003.

RAVERA M.W.; CARCAMO J.; BRISSETTE R. Identification of an allosteric binding site on the transcription factor p53 using a phage-displayed peptide library. **Oncogene**. v.16, n.15, p.1993-1999, 1998.

RIEMER A.; SCHEINER O.; JENSEN-JAROLIM E. Allergen mimotopes. **Methods**. v.32, p.321-327, 2004.

RODI J. D.; SOARES A .S.; MAKOWSKI L. Quantitative Assessment of Peptide Sequence Diversity in M13 Combinatorial Peptide Phage Display Libraries. **Jornal of Molecular Biology.** v.322, p.1039–1052, 2002.

RODRIGUES V. M.; SOARES A. M.; GUERRA-SA' R.; RODRIGUES V.; FONTES M. R. M.; GIGLIO J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 381, n. 2, p.213–224, 2000.

RODRIGUES V. M.; SOARES A. M.; ANDRIÃO-ESCARSOA S. H.; FRANCESCHIC A. M.; RUCAVADOC A.; GUTIÉRREZ J. M.; GIGLIO J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie.** v.83, p.471-479, 2001.

SILVA M. B.; SCHATTNER M.; RAMOS C. R. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I. L. M.; GUARNIERI M. C.; LAZZARI M. A.; SAMPAIO C. A. M.; POZNER R. G.; VENTURA J. S.; HO P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI A. M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem. J.** v.369, p.129–139, 2003.

STEPHEN C. W.; HELMINEN P.; LANE D. P. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insight into antibody-peptide interactions. **J. Mol. Biol.** v.248, p.58–78, 1995.

VAN WEZENBEEK P. M. G. F.; HULSEBOS T. J. M.; SCHOENMAKERS J. G. G. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. **Gene.** v.11, p.129–148, 1980.

WILLIAMS S. C.; BADLEY R. A.; DAVIS, P. J.; PUIJK W. C.; MELOEN R. H. Identification of epitopes within betalactoglobulin recognized by polyclonal

antibodies using phage display and PEPSCAN. **J. Immunol. Methods.** v.213, n.1, p.1-17, 1998.

WU H. C.; YEH C. T.; HUANG Y. L.; TARN L. J.; LUNG C. C. Characterization of Neutralizing Antibodies and Identification of Neutralizing Epitope Mimics on the *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type A. **Applied and Environmental Microbiology.** v.64, n.7, p.3201-3207. 2001.

VANHOORELBEKE K.; DEPRAETERE H.; ROMIJN R. A.; HUIZINGA E. G.; DE MAEYER M.; DECKMYN H. A consensus tetrapeptide selected by phage display adopts the conformation of a dominant discontinuous epitope of a monoclonal anti-VWF antibody that inhibits the von Willebrand factor-collagen interaction. **J. Biol. Chem.** v.26, p.15-21, 2003.

6. ANEXOS

2.2. MEIOS DE CULTURA

2.2.1. Meio LB

Para 1 litro: 10g de Bacto-Tryptona, 5g Extrato de Levedura, 5g NaCl. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

2.2.2. Placas com meio LB sólido, contendo IPTG (isopropil α -D-tiogalactosise)/Xgal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosideo)

Meio LB + 15g/l de Ágar. Autoclavar, resfriar até atingir a temperatura de 70°C e adicionar 1ml de IPTG/Xgal. Estocar as placas em local escuro, na temperatura de 4°C.

2.2.3. Agarose Top

Para 1 1000ml: 10g de Bacto-Tryptona, 5g Extrato de Levedura, 5g NaCl, 1g MgCl₂•6H₂O, 7g Agarose. Autoclavar.

2.2.4. Estoque de Tetraciclina

20mg/ml em Etanol. Estocar a -20°C em frasco escuro.

2.2.5. Placas de meio sólido com Tetraciclina

Meio LB + 15g/l Agar. Autoclavar, resfriar até 70°C e adicionar 1ml do estoque de Tetraciclina.

F000032560-3