



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

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS APRESENTADOS EM FAGOS E SELEÇÃO DE CLONE
NEUTRALIZANTE DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE *Bothrops
pauloensis***

Aluno: Rone Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA – MG
2008



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

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS APRESENTADOS EM FAGOS E SELEÇÃO DE CLONE
NEUTRALIZANTE DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE *Bothrops
pauloensis***

Aluno: Rone Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA – MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C268c Cardoso, Rone, 1974-

Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais apresentados em fagos e seleção de clone neutralizante de toxinas presentes na peçonha de *Bothrops pauloensis* / Rone Cardoso. - 2008.

114 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética molecular - Teses. 2. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 3. Anticorpos monoclonais - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.21



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

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS APRESENTADOS EM FAGOS E SELEÇÃO DE CLONE
NEUTRALIZANTE DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE *Bothrops
pauloensis***

Aluno: Rone Cardoso

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores:

Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (Universidade Federal de São Carlos)

Andreimar Martins Soares (Universidade de São Paulo)

Carlos Ueira Vieira (Universidade Federal de Uberlândia)

Veridiana de Melo Rodrigues (Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia)

Data de Defesa: 31/07/2008

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

(Orientador)

Eu, O Tempo, O Sonho e O Caminho

Quando, desde a infância, dias e noites sonhava, nunca imaginei que uma utopia tão distante tomaria forma. Quando levantei meus olhos e entendi que caminhava sozinho, que isso significaria pagar preços. Caminhei, e o fiz como opção de dias melhores. Caminhei em busca de uma ciência desconhecida, porém idealizada. Um saber o qual eu não conhecia, mas os sábios poderiam um dia me ensinar. Caminhar em direção a eles era o desafio, mas onde encontrá-los? Quanto mais distantes eram os percursos, mais eu tentei olhar para frente e não perder a firmeza dos pés e da força que me impulsionava a caminhar. Os erros sucessivos, as noites em claro, as noites nem dormidas, nas quais a cama e o travesseiro foram parceiros de solidão e questionamentos, tudo fez parte. Aos tantos amigos e inimigos do caminho, aos amigos a parceria e a vontade de dar a eles um pedaço da conquista, aos inimigos o agradecimento, porque com ira deles eu aprendi que caminhar não depende de obstáculos, depende de vontade e de força, eles foram estímulos. Aos amigos, como não vê-los, como não reconhecê-los, como não dividir com eles o pódio? Houve dias em que a solidão me consumiu, em que o desespero me fez quase desistir do sonho dos dias de criança e adolescência. A infância dos tempos difíceis, da vida pequena vendo os grandes, e do sonho de um dia poder não ser mais um qualquer. De todos os passos, e sonhos, e longos caminhos, e fracassos, e êxitos, e pódio, resta apenas um reconhecimento. Que o caminho foi percorrido porque houve alguém que ouviu minha voz no meu silêncio de pânico, que me chamava cada dia mais pra próximo dizendo que me via e iria comigo caminhar. Soube que o Senhor me amava e me ensinou com tudo isso que não sou senhor de mim, nem de minhas utopias, nem de minhas buscas, muito menos de minhas longas caminhadas. O senhor merece meu reconhecimento, minha gratidão desenvolvida em dias negros que como mágica se tornaram claros. Aprendi que o senhor me ama, e quis tudo isso, para que no percurso eu o visse.

A Deus toda a minha gratidão pelos parceiros colocados

para partilhar a caminhada.

Meu reconhecimento porque o Senhor os doou a

mim nos dias certos, em momentos exatos. Foram tão exatos

que me permitiram chegar aqui hoje.

Dedicatória

Ao Senhor, Deus e Amigo Incondicional.

Em dias de medo e dúvida, quando o meu coração sentiu-se só e a incerteza foi referência, pude descobrir em ti meu refúgio, pude ter de ti a certeza que, embora meus sentimentos me remetessem à solidão, tu estavas comigo. Eu reconheço que para o Senhor nada é impossível e que nenhuns dos teus planos podem ser impedidos (Jó 42:02).

Mesmo faltando palavras para reconhecer a grandeza de sua presença em minha existência, em meu coração jamais faltará gratidão pelo teu amor e presença em minha vida nos momentos que ninguém poderia mensurar minha busca por um porto seguro.

O Senhor é o responsável direto pela existência do agora.

Agradecimentos

Aos meus pais que me deram a vida.

A minha mãe em especial por alimentar o sonho de grandes feitos, de grandes êxitos, e pela forma como se dedica.

Aos meus irmãos, porque sei que trago um sonho, e sei também que vocês presenciaram o preço pago pela caminhada.

Aos meus dois sobrinhos e sobrinha.

Como não reconhecer aqui os que compartilharam da caminhada.

O agradecimento pela parceria no dia a dia, porque deram muito do tempo de vocês, de suas vidas e vivências, de suas habilidades como pesquisadores (as) e amigos (a).

- Mirian por sua tenacidade, competência e disponibilidade, sua naturalidade e calma foram decisivas, seu tempo dedicado foi de valor inestimável.
- Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, seu otimismo como orientador que não vê limite, sonha alto, nos manda ir e acaba por nos fazer viabilizar grandes coisas também.
- Profa. Dra. Veridiana, amiga e conselheira desde os primeiros anos, até o último momento você mostrou-se como amiga.
- Profa. Sueli, não poderia deixá-la de fora, quando tudo começava, você foi grande amiga, quase mãe, dividiu tudo que tinha, os anos passaram, mas a gratidão será para sempre.
- Profa. Dra Maria Inez e Profa. Dra Amélia, sempre vou olhá-las como aquelas que ensinaram os primeiros passos bioquímicos.
- Profa. Dra. Andréia Maranhão, em meio ao sufoco, mais uma vez você foi além da condição de pesquisadora, foi acalentador perceber sua disponibilidade em momentos de busca por referencial.
- Bel, Juliana, Luciana, Malson, Sâmela e Thaisa, vocês foram companheiras (o) presentes nesta fase de pouco tempo para muito a se fazer, foram muitas horas dedicadas.
- Welson reconheço a sua incansável e imprescindível participação neste trabalho. Seu apoio foi determinante para os resultados aqui obtidos. Não tenho como agradecer.
- Patrícia são muitos os motivos, mas deixarei aqui minha gratidão pela noite em que cansados, mas insististes e ficamos juntos, na busca pelo resultado desejado repetidas vezes e horas a fio.

- Carolina, sua paciência, sua tranquilidade, sua dedicação, você não desistia mesmo nos momentos em que eu queria quebrar tudo e sair correndo. Tenho uma dívida com você.
- Ana Carolina, sua vida é um exemplo a mim, você foi parceira e amiga, soube sentir minha necessidade de ajuda. O semestre, a publicação, dentre outros. Disponibilizou o seu melhor, te ver lutando sem cansar pelos grandes desafios de sua vida me inspira.
- Dr. Carlos Prudêncio, foi importante nas ponderações e discussões.
- Dr. Carlos Ueira, foi importante a discussão, as decisões e sugestões, elas acresceram meu pensar ampliando minha visão.
- Dalva, nos anos distantes da adolescência e início de juventude, você me tratou como filho, e me ensinou que sonho e caminho são conquistáveis, que Deus é referencial para a existência humana, eu aprendi a lição e nos momentos mais difíceis lembrei-me do Deus daqueles tempos.
- Bruno e Renata Gatti, amigos de caminhada desde os primeiros anos de bioquímica, vocês dois são referências de amizade.
- CNPQ, viabilizador do meu doutorado, sem seu apoio e recursos jamais teria concluído este trabalho.
- Laboratório de Genética Molecular, minha casa onde cresci como pesquisador e uma porta que se abriu e nunca se fechou.

SUMÁRIO

	Página
Apresentação	01
Referencial Teórico	04
1. As serpentes e o homem	05
2. Acidentes ofídicos	05
3. Alterações clínicas do envenenamento	06
4. A peçonha botrópica	07
5. A peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	11
6. Soroterapia e produção de anti-venenos	13
7. Reatividade cruzada	14
8. Imunoglobulinas	15
9. Anticorpos de galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>) e a diversidade de suas cadeias variáveis	17
10. Fragmentos de anticorpos	22
11. Bibliotecas combinatórias de anticorpos apresentados em fagos filamentosos: <i>Phage Display libraries</i>	27
12. Utilização de bibliotecas de anticorpos na identificação de anticorpos neutralizantes de toxinas animais	30
13. Referências	32
Capítulo único	40
1. Resumo	41
2. Abstract	42
3. Introdução	43
4. Objetivo	45
5. Materiais e métodos	46
5.1. Linhagens bacterianas	46
5.2. Plasmídeo	46
5.3. Bacteriófago auxiliar	46
5.4. Meios de Cultura	47
5.5. Antibióticos	48
5.6. Soluções de uso geral	48
5.7. Soluções utilizadas no procedimento de seleção da biblioteca	49
5.8. Soluções para eletroforese em Gel Agarose e de Poliacrilamida	50
5.9. Soluções para ELISA, <i>Dot blot</i> e <i>Western blot</i>	52
5.10. Soluções para purificação de proteína em Coluna de Níquel Sepharose (HPLC)	53
5.11. Soluções para preparação de DNA plasmidial	54
5.12. Enzimas e <i>kits</i> utilizados	55
5.13. Oligonucleotídeos sintéticos específicos	57
5.14. Anticorpos conjugados	58
5.15. Obtenção de Neuwiedase e peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i>	58
5.16. Animais	58
5.17. Imunizações das galinhas	59
5.18. Extração de RNA total	60
5.19. Síntese de cDNA	60
5.20. Amplificação dos fragmentos das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha	61

5.21.	Amplificação dos fragmentos scFv de galinha (<i>Overlap</i>)	62
5.22.	Digestão dos fragmentos scFv e do vetor pComb3X com a enzima <i>Sfi</i> I	62
5.23.	Ligação dos fragmentos de DNA scFv com o vetor pComb3X	63
5.24.	Preparação de células XL1-Blue eletrocompetentes	63
5.25.	Transformação de células <i>E. coli</i> (XL1-Blue) por eletroporação	64
5.26.	Preparação de DNA plasmidial em placa de Microtitulação	64
5.27.	Seqüenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones	66
5.28.	Análise das seqüências	67
5.29.	Preparação do fago auxiliar VCSM13	67
5.30.	Obtenção de partículas virais a partir de células transformadas com Fagomídeos (biblioteca scFv)	68
5.31.	Seleção da biblioteca de scFv contra peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i>	69
5.32.	Extração de DNA plasmidial de bactérias (XL 1 blue) do terceiro ciclo de seleção	72
5.33.	Transformação da linhagem de <i>E. Coli</i> não supressora Top 10 com fagomídeos provenientes do terceiro ciclo de seleção	73
5.34.	Produção de scFv na forma solúvel (sem a proteína III do fago) em placa <i>deep well</i>	74
5.35.	<i>Dot blot</i> para análise da expressão heteróloga de moléculas scFvs	75
5.36.	Ensaio de ELISA com peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e da Neuwiedase (metaloprotease fibrinogenolítica da peçonha de <i>B. pauloensis</i>)	75
5.37.	Dot Blot	76
5.38.	Produção de scFv em grande escala	77
5.39.	Concentração do sobrenadante de cultura em coluna Centriprep	77
5.40.	Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC	77
5.41.	Análise de proteínas em Gel SDS-PAGE	78
5.42.	Ensaio de <i>Western Blotting</i>	79
5.43.	Atividades Biológicas	80
5.43.1	Inibição da atividade hemorrágica	80
5.43.2	Inibição da Atividade Miotóxica	81
5.44	Atividades enzimáticas	81
5.44.1	Inibição da atividade fibrinogenolítica	81
5.44.2	Inibição da atividade fosfolipásica	82

6. Resultados	83
6.1. Imunizações de galinhas com peçonha bruta de <i>B. pauloensis</i>	83
6.2. A amplificação dos genes que codificam as cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha e amplificação do fragmento scFv (<i>Overlap</i>)	84
6.3. Análise da diversidade da biblioteca	87
6.4. Seleção de fagos presentes na biblioteca combinatorial de anticorpos contra antígenos da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i>	90
6.5. Transformação da linhagem de <i>Escherichia coli</i> não supressora (TOP10) com fagomídeos provenientes do quarto ciclo de seleção e expressão de moléculas scFv em solução	90
6.6. Produção e purificação de scFv em larga escala	94
6.7. Avaliação do perfil de antígenos presentes na peçonha de <i>B. pauloensis</i> reconhecidos pelo scFv (C5)	95
6.8. Inibição das atividades biológicas	97
6.9. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta	97
6.10. Inibição da atividade miotóxica	98
6.11. Inibição das atividades enzimáticas	98
6.12. Inibição da atividade fibrinogenolítica	98
6.13. Inibição da atividade fosfolipásica	99
7. Discussão	100
8. Conclusão	108
9. Perspectivas	108
10. Referências	109

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 -	Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil.....	06
Figura 2-	Representação esquemática de uma IgG.....	16
Figura 3-	Organização dos <i>locus</i> de imunoglobulina de galinhas.....	20
Figura 4-	Molécula de imunoglobulina e seus fragmentos após a clivagem com pepsina e papaína.....	22
Figura 5-	Representação esquemática do fragmento scFv.....	23
Figura 6-	Representação esquemática de diferentes fragmentos de anticorpos.....	24
Figura 7-	Representação esquemática de uma molécula scFv fusioanada a PIII do fago filamentosos.....	29

Capítulo Único

Figura 1-	Seleção de fagos, expressando as diferentes formas scFvs	71
Figura 2-	Resposta de anticorpos em soros de galinhas para imunizações com peçonha bruta de <i>B. pauloensis</i>	83
Figura 3-	Representação esquemática de reações em cadeia da polimerase para síntese dos genes scFvs	85

Figura 4-	Representação esquemática do vetor de expressão pComb3X após a clonagem do scFv	86
Figura 5-	Comparação entre as sequências de aminoácidos deduzidas de clones VL (A) e VH (B) e a sequência correspondente a linhagem germinativa de galinha	88
Figura 6-	<i>Dot Blot</i> de clones induzidos por IPTG (terceiro ciclo de seleção)	91
Figura 7-	Análise por ELISA direto mostrando a imunorreatividade de anticorpos expressos em solução contra a peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e, Neuwiedase	93
Figura 8-	Imunogenicidade de moléculas scFvs em sobrenadante induzido do clone C5 contra a peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	93
Figura 9-	<i>Dot Blot</i> e eletroforese em gel de poliacrilamida 16% para analisar a purificação de moléculas scFvs	95
Figura 10-	Perfil antigênico da peçonha bruta de <i>B. pauloensis</i> reconhecido pelo anticorpo scFv (C5)	96
Figura 11-	Análise de inibição da atividade hemorrágica	97
Figura 12-	Inibição da atividade proteolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e da Neuwiedase sobre fibrinogenio bovino	99
Figura 13-	Representação gráfica do ensaio de inibição da atividade fosfolipásica	99

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - Principais compostos bioquímicos da peçonha botrópica.....	08
Tabela 2 - Fragmentos de anticorpos Fab aprovados (ou em testes) nos EUA para uso terapêutico.....	25
Tabela 3 - Fragmentos de anticorpos scFv e derivados aprovados (ou em testes) nos EUA para uso terapêutico.....	26

Capítulo Único

Tabela 1 - Oligonucleotídeos sintéticos.....	57
Tabela 2 - Títulos obtidos em quatro ciclos de seleção de uma bibliotecas de fagos-scFv contra peçonha bruta de <i>B. pauloensis</i>	90
Tabela 3 - Representação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos fragmentos variáveis de cadeia leve e pesada de quatro clones (C5, F1, F5 e F8) seqüenciados.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP	<i>Bromochloroindolyl phosphate</i>
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CDR	Região determinante de complementariedade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
OD	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y (Yolk)
INGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
IPTG	Isopropil α -D- thiogalactopyranoside
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NBT	Nitroblue tetrazolium
rpm	Rotação por Minuto
RNA	Ácido Ribonucleico
pb	Pares de base
pComb3X	Vetor de clonagem
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEG	Polietileno glicol
PIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
scFv	Fragmento variável de cadeia única
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Enzima DNA Polimerase)

TBS	Tampão Tris Base-Salino
TBST	Tampão Tris Base-Salino com Tween-20
U	Unidade de Atividade Enzima
ufc	Unidades formadoras de colônias

Apresentação

A decorative L-shaped grid pattern, consisting of a horizontal line and a vertical line meeting at a right angle, forming a corner. The grid is composed of small squares.

Registros indicam o gênero *Bothrops* como responsável por 90,5% de todas as picadas de serpentes peçonhentas no Brasil (MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS 1999). O envenenamento botrópico caracteriza-se por inflamação, edema e necrose na região da picada com extenso dano tecidual local, e também efeitos sistêmicos, tais como: hemorragias, desfibrinogenação e trombocitopenia, podendo levar à falência renal (GUTIÉRREZ & LOMONTE 1989; MANDELBAUM *et al.* 1989; GUTIÉRREZ 1990).

A distância entre o local do acidente e o local onde ocorre o atendimento especializado torna o acidente fatal. A demora na administração do anti-veneno causa os danos citados. Além disso, na maioria dos casos, a espécie responsável pelo envenenamento raramente é identificada.

Estudos têm demonstrado a presença de antígenos comuns nas peçonhas ofídicas de diferentes famílias, gêneros ou espécies. Sendo assim, as peçonhas podem estar relacionadas entre si, farmacológica e/ou estruturalmente, e isso permite a conseqüente neutralização por anti-veneno heterólogo (MÉNEZ 1985). Dentre os trabalhos envolvendo o tema, alguns têm indicado a composição ideal de antígenos para a produção de anti-venenos (GRASSET *et al.* 1956; THEAKSTON & REID 1979), pois a presença ou não de componentes comuns nas peçonhas de espécies do mesmo gênero faz com que as peçonhas de certas espécies sejam indispensáveis nas formulações antigênicas, enquanto outras se tornam redundantes. Assim, para se obter um anti-veneno efetivo, é importante conhecer a composição antigênica das peçonhas das serpentes (CAMEY *et al.* 2002).

Em geral, a produção de anti-venenos brasileiros é feita por imunização de cavalos, na qual o antígeno é preparado com uma mistura de adjuvante e peçonhas do mesmo gênero (monoespecífico) ou de gêneros diferentes (poliespecífico). A alta toxicidade desta mistura causa vários danos ao organismo animal, sendo que em torno de 10% destes animais morrem durante o processo (RIBEIRO *et al.* 1993).

Além disso, ocorre o contato do organismo da vítima de envenenamento com uma grande quantidade de imunoglobulinas heterólogas, muitas delas sem ação sobre a peçonha (THEAKSTON & REID 1983). Por conseqüência, há

aumento nas possibilidades de choque anafilático, doença do soro e efeitos adversos (WAGSTAFF 2006).

Em virtude dos fatos mencionados acima, métodos alternativos para se obterem anticorpos neutralizantes de toxinas ofídicas, que apresentem reatividade cruzada com os vários componentes da peçonha, e despertem baixas ou nenhuma resposta imune ao organismo humano e, ainda, que não utilizem animais em sua produção, apresentam um elevado valor.

Neste contexto, optamos por produzir uma biblioteca de anticorpos combinatoriais específicos contra toxinas da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. Este trabalho permitiu a seleção de anticorpos monoclonais tipo scFvs específicos aos diferentes tipos de toxinas presentes na peçonha, o que viabiliza melhorias na purificação e caracterização de toxinas ainda não descobertas, e também na neutralização de efeitos tóxicos. Um monoclonal scFv pode ser específico a várias toxinas diferentes presentes na peçonha; assim, a quantidade de moléculas neutralizantes é mínima, porém o espectro de neutralização é amplo. Com isso, torna-se reduzida a quantidade de moléculas heterólogas com as quais as vítimas de envenenamentos entram em contato.

Referencial Teórico

A decorative L-shaped line composed of a fine grid pattern, extending horizontally from the left and vertically upwards from the right, framing the title.

1. As serpentes e o homem

Na percepção filosófica, o mito dá sentido à vida, tem como base a religião e a função de fundamentar um povo. A partir disso, é possível entender a presença de serpentes inseridas na cultura. Como simbologia grega, a serpente representou sabedoria e medicina, pela qual é adotada até hoje. Já no Egito, Isis, deusa símbolo da família, transformou-se numa serpente; contudo, no Gênesis bíblico, a serpente é associada à imagem de forças malévolas, após corromper o homem estimulando-o a procurar sabedoria no Éden. Porém, a mesma Bíblia cita que a serpente foi adorada pelos judeus entre o reinado de Judá a Ezequiel. Ela estava presente na entrada de templos Incas e Maias, era considerada guardiã e deusa na forma de serpente emplumada.

As serpentes, como animais da fauna, têm seu grande papel de equilíbrio ambiental, no controle de pragas, tais como roedores, e mesmo na predação de superpopulações de anfíbios. Contudo, estes animais podem invadir espaços ocupados pelo homem, causando consequências graves. No geral, as serpentes estão presentes principalmente em locais onde existem muitos roedores, por acúmulo de lixo ou por armazenamento de grãos; a esses locais o ofídio vai em busca de seu alimento. Quando animais domésticos ou humanos invadem o habitat natural das serpentes, elas, ao serem ameaçadas, atacam; normalmente, isso ocorre em locais de vegetação alta e à noite, quando os ofídios estão se alimentando. Em campos de cultura (arrozais, cafezais etc.) e locais onde há desequilíbrio ecológico, a ausência de predadores promove um aumento na população ofídica e, conseqüentemente, um aumento de acidentes (BOFF & MARQUES 1996).

2. Acidentes ofídicos

Existem hoje no Brasil 357 espécies de serpentes catalogadas, das quais, 54 são peçonhentas e, destas, 27 são da família Elapidae (cobras corais) e outras 27 pertencem a família Viperidae (víbora com fosseta), dentre estas, 22 são do gênero *Bothrops* (SBH 2008). Esses animais possuem acentuada importância à saúde pública em virtude do grande número de pessoas envolvidas em acidentes ofídicos, também pela gravidade das lesões deixadas por eles, pois apresentam índices significantes de morbidade e mortalidade. Por meio de dados enviados à

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) do Ministério da Saúde, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, observa-se que acidentes envolvendo o gênero *Crotalus* são os mais letais (1,87% de letalidade) e ocorrem com incidência de 7,7%. Enquanto isto, os gêneros *Lachesis* e *Micrurus* apresentam ofidismos com letalidades de 0,95% e 0,36% e, incidências de 1,4% e 0,4%, respectivamente. Apesar da baixa letalidade observada para o gênero *Bothrops* (0,31%), acidentes com estes animais possuem alta incidência (90,5%) (FIGURA 1) (MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 1999). Assim, algumas empresas e pesquisadores de áreas médicas procuram ampliar e melhorar as formas diagnósticas e terapêuticas para os casos de ofidismo.

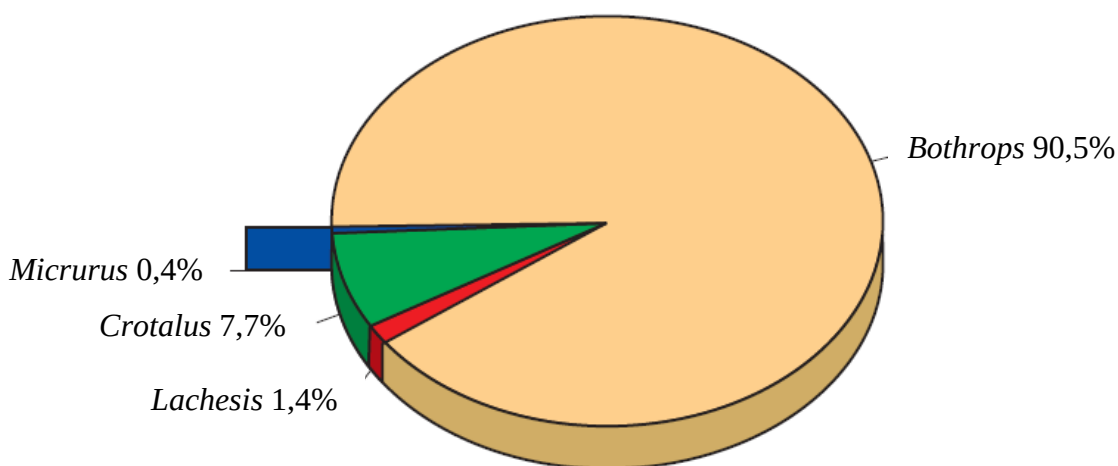


Figura 1 - Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil (1990 – 1993), segundo o gênero da serpente causadora do acidente. FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001.

3. Alterações clínicas do envenenamento

Serpentes da família Elapidae possuem peçonha altamente neurotóxica que pode causar morte por bloqueio da transmissão neuromuscular. De outro lado, peçonhas das famílias *Viperidae* e *Cratalidae* causam edema, choque, necrose tecidual, coagulação intravascular, hemorragias local e sistêmica (NIEWIAROWSKI *et al.* 1994).

As principais alterações sistêmicas presentes no envenenamento botrópico 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, hipotensão 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 associarem à necrose (CARDOSO 1997). Os fatores determinantes da gravidade dos efeitos locais são a quantidade de peçonha 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).

4. A peçonha botrópica

A constituição das peçonhas de serpentes varia entre espécies, sendo formadas por misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos. Como exemplos de compostos inorgânicos, temos: magnésio, cobre, cálcio, ferro, potássio, sódio, fósforo, manganês, zinco e cobalto. Alguns destes, como zinco, ferro, cobre e cobalto, apresentam funções relacionadas com mecanismos catalíticos de determinadas enzimas presentes na peçonha, como as metaloproteases (BJARNASON & FOX 1994). As moléculas orgânicas da peçonha são carboidratos (em glicoproteínas), lipídios (fosfolipídios), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos (BJARNASON & FOX 1994); contudo, a maior parte, entre 90 a 95% do peso seco da peçonha, é de origem protéica (MARKLAND 1998a).

Peptídeos e proteínas conferem à peçonha efeitos biológicos locais e sistêmicos complexos, que podem ser resultantes da ação de moléculas isoladas ou do efeito sinérgico entre várias moléculas. Destes componentes, diversas funções são conhecidas, porém ainda há moléculas a serem desvendadas tanto estrutural quanto funcionalmente (WARRELL *et al.* 1989). Um resumo dos principais componentes da peçonha botrópica são apresentados na Tabela 1. Numerosas ações fisiopatológicas da peçonha estão hoje bem caracterizadas (FRANÇA & MÁLAQUE 2003) e isto pode ser observado no envenenamento botrópico, no qual são descritas três atividades principais: hemorrágica, coagulante e proteolítica (ROSENFELD 1971).

Várias toxinas com características bioquímicas distintas são responsáveis pela atividade proteolítica da peçonha, estas proteases podem agir sob a vítima degradando suas proteínas teciduais, de maneira não específica e clivando proteínas plasmáticas de forma específica.

Tabela 1: Principais compostos Bioquímicos da peçonha Botrópica. Algumas frações protéicas, não-protéicas e peptídicas identificado na peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*. Adaptado de Iwanaga & Suzuki (1979); Markland (1) (1998).

<i>Principais Componentes bioativos da peçonha Botrópica</i>				
Enzimáticos	Não Enzimáticos	Efeitos	Orgânicos	Inorgânicos
Fosfolipase	Lectinas	Neurotóxicos	Aminas biogênicas	Cálcio
Fosfoesterase	Fatores de Crescimento de nervos	Citotóxicos	Carboidratos	Cobre
L- aminoácido oxidase	Precusores de peptídeos bioativos	Miotóxicos	Aminoácidos	Ferro
Protéicos	Acetilcolinesterase	Potenciadores de Bradicinina	Citratos	Potássio
	Serinoesterase	Natriuréticos	Nucleotídeos	Magnésio
	Metaloprotease	Cardiotóxicos		Manganês
	Hialuronidases			Sódio
	Catalases			Fósforo
	Aminotransferases			Cobalto
				Zinco

Os produtos destas reações, no geral, são compostos que apresentam potente efeito na hemostasia (MATSUI *et al.* 2000). Alguns componentes da peçonha contribuem com a atividade inflamatória, e suas principais representantes são: fosfolipase A2, esterases, aminas biogênicas do tipo histamina, cininogenases, peptídeos potenciadores de bradicinina (IWANAGA & SUZUKI 1979). As toxinas capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fatores da coagulação são as responsáveis pela atividade sobre a coagulação, elas promovem a formação de fibrina intravascular e consumo do fibrinogênio. Já a atividade hemorrágica provém da ação de hemorraginas (geralmente

metalo-proteases) que rompem o endotélio vascular por degradação da matriz extracelular.

As peçonhas ofídicas são constituídas por uma variedade de toxinas distintas, no entanto, as proteases e fosfolipases A_2 são as principais responsáveis por grande parte dos efeitos tóxicos observados. Serinoproteases e metaloproteases estão entre as principais classes de proteases presentes em peçonhas de serpentes, estas toxinas são assim classificadas com base em suas estruturas. As fosfolipases A_2 desencadeiam uma série de alterações patológicas onde se destacam os efeitos sobre a hemostasia, mionecrose e edema. Fosfolipases A_2 (PLA_2) são enzimas lipolíticas que clivam especificamente a ligação sn-2-acil dos fosfolípidos de membrana para produzir quantidades equimolares de lisofosfatídeos e ácidos graxos livres, principalmente, o ácido araquidônico. Estes produtos, então, tornam-se disponíveis para a conversão em potentes mediadores pró-inflamatórios, como o fator ativador de plaquetas e os eicosanóides (DENNIS 1978; CHANG *et al.* 1987). As fosfolipases A_2 apresentam similaridades estruturais entre si que variam de 40 a 99% (KINI; 2003).

As serinoproteases podem representar até 20% do conteúdo protéico de algumas peçonhas das famílias Viperidae e Crotalidae (WISNER *et al.* 2001). Estas toxinas são sintetizadas na forma de zimogênio, em geral, são enzimas constituídas por um número médio de 235 aminoácidos; dos quais, 6 consistem em cisteínas, e 5 (ITO *et al.* 1988) ou 12 (BRAUD *et al.* 2000) formam pontes dissulfeto. Muitas serinoproteases encontradas na peçonha botrópica 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 sangüínea. 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 (2) 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 dos

grupos que foram expostos pela ação enzimática. Forma-se então o coágulo “frouxo” de fibrina, pois ainda não existe ligação cruzada entre esses monômeros (WHITE *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 é capaz de ativar o fator XIII, desta maneira, há formação somente do coágulo “frouxo” (COLMAN *et al.* 1993).

As metaloproteinases botrópicas, compreendem uma série de enzimas “zinco-dependentes” com diferentes massas moleculares que são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico de envenenamentos (BJARNASON; FOX 1994). Além disso, 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 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 estruturais, as metaloproteinases zinco dependentes são classificadas em quatro grupos distintos (HOOPER 1994; GOMIDIS-RUTH 2003): 1- **Zincinas**: contêm a sequência conservada **HEXXH**, como motivo de ligação ao zinco; 2- **Inverzincinas**: possuem 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 (aquelas 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 (crustáceos), serralisinas (bactérias), matrixinas (metaloproteinases de matriz) e metaloproteinases, presentes em peçonhas 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. FOX, SERRANO (2008) 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 dissulfeto à cadeia polipeptídica da metaloproteinase, a massa molecular pode variar de 80 a 100 kDa.

5. A peçonha de *Bothrops pauloensis*

A espécie *Bothrops neuwiedi* conhecida popularmente por jararaca do rabo branco ou jararaca pintada foi descrita por AMARAL (1925). Era considerada uma única espécie com 12 subespécies, entretanto após uma revisão sistemática em

2000 (SILVA 2000) estas subespécies foram elevadas a sete espécies distintas. Essa classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia-SBH (2008) e assim a espécie *Bothrops neuwiedi pauloensis* passou a ser *Bothrops pauloensis*.

A peçonha de *Bothrops 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. As fosfolipases A₂ denominadas BnSP6, BnSP7, BnpPLA₂, BnpTXI e BnpTXII foram isoladas, estas enzimas apresentam atividade miotóxica (RODRIGUES *et al.* 1998; RODRIGUES *et al.* 2004; RODRIGUES *et al.* 2007). Uma metaloprotease da classe P-I, denominada Neuwiedase (Neu), que apresentam somente o domínio metaloproteinase na proteína madura, que compreende uma enzima com 198 aminoácidos, massa molecular de 22 kDa e ponto isoelétrico 5,9.

A Neu apresenta baixa atividade hemorrágica, possui atividade proteolítica sobre fibrinogênio, fibrina e alguns componentes da matriz extracelular. Resultados experimentais em camundongos mostraram que esta toxina não induz hemorragia quando injetada no músculo gastrocnêmio, porém provoca sangramento em músculo cremáster e causa hemorragia pulmonar somente em doses maiores que 5µg/g, via intravenosa em camundongos. A Neu possui similaridade estrutural de 71% com metaloproteases presentes em peçonhas de espécies diferentes, alguns exemplos são: Adamalisina II e Atroxase (RODRIGUES *et al.* 2000, 2001).

6. Soroterapia e produção de anti-venenos

Os primeiros registros da utilização de soros (imunoglobulinas) para fins terapêuticos foram concebidos pelo médico alemão Emil Adolf Von Behring e seu colaborador Shibasaburo Kitasato, eles conseguiram neutralizar as toxinas tetânica e diftérica. Por seus feitos, o médico recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1901 (NOBELPREIS 2008). Após estas descobertas, múltiplos trabalhos foram desenvolvidos sobre imunoglobulinas e o sistema imune, incluindo a aplicação destes na medicina. Contudo, o uso de soros como neutralizantes de toxinas de peçonhas ofídicas (soroterapia ofídica) foi inicialmente divulgado por dois grupos: Calmette e Phisalix & Bertrand, os quais demonstraram os efeitos protetores de anti-soros sob a peçonha de *Naja naja* (CALMETTE 1894; PHISALIX & BERTRAND 1984).

A teoria de Calmette foi questionada por Vital Brasil, que mostrou a ineficácia de soro anti-*Naja naja* em neutralizar a ação das peçonhas de serpentes brasileiras, com isto, ele definiu a idéia da especificidade dos anti-venenos (HAWGOOD 1992). Vital Brasil foi o pioneiro na produção de anti-venenos brasileiros, iniciou seus trabalhos em 1903 com peçonhas das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*; suas pesquisas repercutem até hoje no meio acadêmico, pois o único tratamento efetivo contra o ofidismo é a soroterapia (WORLD HEALTH ORGANIZATION 1981).

Os soros antiofídicos são produzidos em animais, geralmente cavalos, utilizando-se a peçonha bruta como imunógeno associado com adjuvantes. Soros monoespecíficos são aqueles produzidos a partir de misturas contendo peçonhas

de serpentes pertencentes ao mesmo gênero, já os soros poliespecíficos são produzidos com misturas de peçonhas derivadas de gêneros ofídicos distintos. Como exemplo, o soro antibotrópico (monoespecífico) é constituído pela mistura de peçonhas pertencentes a cinco espécies do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pauloensis*, *B. alternatus* e *B. moojeni*). No Brasil, existem três instituições envolvidas na produção de soros antiofídicos mono e poliespecíficos (Instituto Vital Brazil, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias).

Imunoglobulinas presentes nos anti-soros são específicas a muitos antígenos desconhecidos nas peçonhas, incluindo componentes não tóxicos, o que exige contato da vítima do envenenamento com uma ampla quantidade de imunoglobulinas heterólogas ao seu organismo, muitas delas sem ação sobre a peçonha (THEAKSTON & REID 1983). Este fato é agravado quando são utilizados anti-soros poliespecíficos, pois a diversidade de anticorpos é maior e a eficiência menor quando comparadas aos anti-soros monoespecíficos.

O contato do paciente com excesso de proteínas estranhas (anticorpos de cavalos) pode causar choque anafilático e outras reações alérgicas diversas, dentre as quais se destaca a doença do soro. A doença do soro é caracterizada por reações cutâneas que, em casos graves, provocam insuficiência renal (WAGSTAFF 2006). Apesar disso, a escolha da soroterapia baseia-se apenas em sinais clínicos apresentados pelo paciente durante o atendimento e, quando possível, na identificação do animal agressor (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1991). Desta forma, a maioria dos diagnósticos é incerta, e os anti-soros mais utilizados são os poliespecíficos. O anti-veneno ideal deveria estar prontamente disponível para administração imediata e mostrar reação cruzada com um grande número de peçonhas, além de causar poucas reações alérgicas (SÁNCHEZ *et al.* 2003).

7. Reatividade cruzada

A ocorrência de domínios conservados nas metaloproteinases, fosfolipases e outras toxinas ofídicas é um aspecto importante na produção de anticorpos neutralizantes; as regiões imunogênicas e altamente conservadas destas toxinas podem induzir a formação de anticorpos, os quais são capazes de neutralizar as ações de várias toxinas diferentes da mesma peçonha, e de toxinas presentes em peçonhas distintas (HARRISON *et al.* 2003). RODRIGUES *et al.* (2001)

produziram anticorpos policlonais anti-Neuwiedase, que foram capazes de neutralizar a atividade hemorrágica da peçonha bruta de *B. pauloensis*, evidenciando imunidade cruzada entre a Neu e outras toxinas hemorrágicas da peçonha bruta. Desta forma, foi sugerida a presença de epítomos comuns entre a Neu e domínios metaloproteinase de toxinas com grandes massas moleculares que ocorrem nas peçonhas. Por esta mesma via, algumas análises de *Western blotting* mostraram que proteínas de peçonhas botrópicas são reconhecidas por anti-soros crotálicos, confirmando a presença de epítomos conservados entre peçonhas de gêneros distintos (ROODT *et al.* 1998). A ação cruzada também foi comprovada com anticorpos produzidos contra a crotoxina, uma fosfolipase A₂ purificada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Estes anticorpos mostraram-se capazes de neutralizar os efeitos miotóxicos e neurotóxicos da Bothropstoxina-I (fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*), e também da peçonha bruta de *B. jararacussu*. Assim, a característica de bom imunógeno, presente na crotoxina, foi admitida (OSHIMA-FRANCO *et al.* 2001; BEGHINI *et al.* 2005; STÁBELI, *et al.* 2005).

8. Imunoglobulinas

Anticorpos ou imunoglobulinas são moléculas capazes de localizar, reconhecer e ligar-se a antígenos específicos com a finalidade de inativar ou dar início a eliminação destes. Essas moléculas são produzidas por linfócitos B, têm caráter glicoprotéico, estão presentes no sangue circulante e na linfa (SILVERTON 1977). Existem cinco classes de imunoglobulinas diferentes (IgM, IgG, IgE, IgA, e IgD), porém todas apresentam uma estrutura central comum (Figura 3). IgG é a classe mais utilizada para fins terapêuticos, e predomina em pesquisas e na indústria biotecnológica (KIM *et al.* 2005).

Os anticorpos são organizados em dois domínios com estruturas e funções distintas, estes compreendem duas cadeias pesadas idênticas (50kDa) e duas cadeias leves idênticas (25kDa), sendo as últimas constituídas por um domínio variável (VL) e um domínio único constante (CL), enquanto as cadeias pesadas contêm um domínio variável (VH) e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). Funcionalmente, os anticorpos são divididos em partes: dois fragmentos de ligação ao antígeno (FABs) e uma região constante (Fc), estas estruturas

permanecem unidas por uma região flexível na forma de dobradiça. Regiões aminoterminais dos domínios variáveis nas cadeias leve (VL) e pesada (VH) constituem a região variável (Fv) e representam os pontos de ligação aos antígenos. Cada domínio variável (V) possui três regiões que são hipervariáveis em suas seqüências de aminoácidos, e ocorrem em forma de *loops*. Estes *loops* hipervariáveis, denominados regiões determinantes de complementariedade (CDRs), são os principais responsáveis pelo reconhecimento antigênico e, em conjunto, formam o paratopo do anticorpo. Os resíduos de aminoácidos presentes nas regiões variáveis, porém fora das CDRs, são enovelados de forma a dar suporte aos loops, assim, estes resíduos apresentam a função de manter cada loop em posição adequada para interagir com o antígeno (Figura 2) (KIM *et al.* 2005).

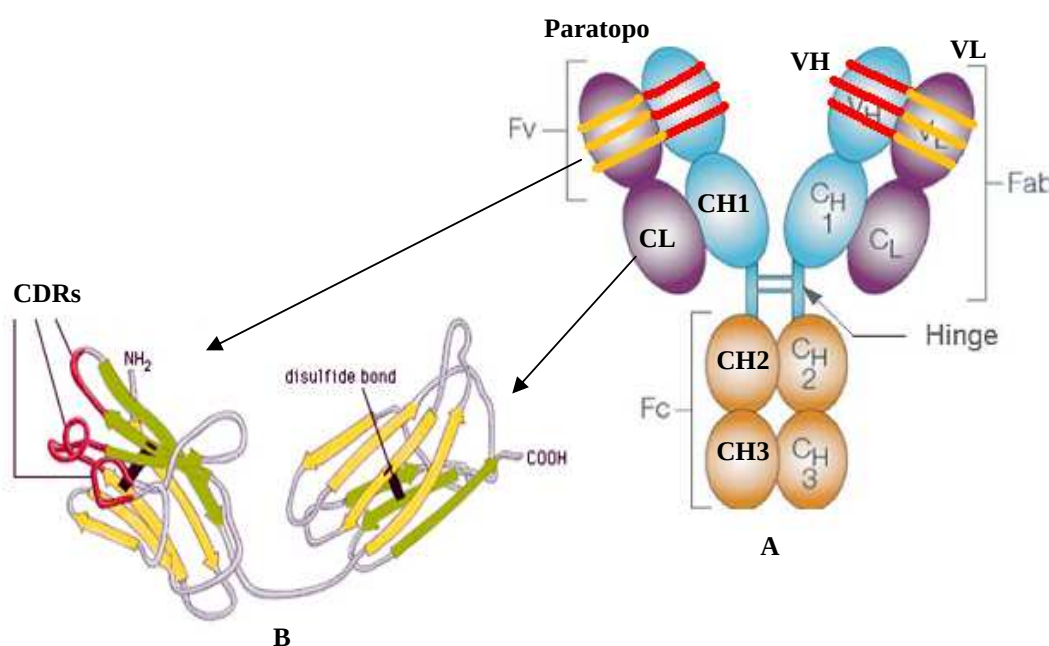


Figura 2. Representação esquemática de uma IgG. Em A: CH1, CH2 e CH3 representam os domínios constantes da cadeia pesada. CL aponta o domínio constante da cadeia leve. VL representa domínio variável da cadeia leve. VH indica o domínio variável da cadeia pesada. Linhas laranja e vermelhas representam as CDRs das cadeias leves e pesadas. Em B: A estrutura do domínio VL destacando-se as CDRs em forma de *loops* (vermelho), as folhas β pregueadas antiparalelas que estabilizam as alças (verde e amarelo); A estrutura do domínio CL mostrando as folhas β pregueadas antiparalelas (verde e amarelo) e uma ponte dissulfeto intracadeia (preto). Figura adaptada de KIM *et al.* 2005.

A porção Fc do anticorpo medeia funções efetoras, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Em respostas tipo ADCC, os anticorpos utilizam a porção Fc para

interação com células efetoras (células NK e macrófagos). Desta forma, podem acionar fagocitose ou lise celular. Contudo, em respostas tipo CDC, os anticorpos destroem a célula alvo por desencadear a cascata do complemento na superfície celular. Além disto, a região Fc está associada com a meia-vida sérica do anticorpo, como exemplo, a IgG humana tipo 1 apresenta uma meia-vida de aproximadamente três semanas, já em fragmentos de anticorpos (sem a porção Fc), a meia-vida reduz-se a algumas horas.

9. Anticorpos de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e a diversidade de suas cadeias variáveis

Anticorpos possuem uma vasta aplicação, principalmente na área médica, podem ser utilizados em tratamentos e diagnósticos de diversas doenças e também como marcadores celulares, moduladores da rejeição em pacientes transplantados, na desintoxicação por drogas, na composição de conjuntos de reativos (*kits*) para diagnóstico como, por exemplo, sarampo, dengue 1, 2, 3 e 4, hepatite A, B e C, leptospirose, febre amarela e na terapia de uma grande variedade de doenças auto-imunes, como artrite, lúpus eritematoso, anemia e asma (HON 2008) e ainda em diversas formas de imunoterapia, como no caso do tratamento de câncer (JÄGER & KNUTH 2005) e de ofidismos.

Os anticorpos monoclonais humanos são os mais indicados na utilização como agentes terapêuticos, entretanto, as fontes de anticorpos humanos restringem-se a indivíduos infectados ou vacinados com o antígeno, assim, raros são os anticorpos terapêuticos efetivos obtidos destas fontes (ADRIS-WIDHOPF *et al.* 2000). Como alternativa, geralmente são obtidos anticorpos específicos por imunizações de animais com o antígeno desejado, seguidas por seleção de clones obtidos em técnicas de hibridomas. Porém, a utilização destes anticorpos em imunoterapias não é recomendada, pois representam proteínas heterólogas ao organismo humano; assim, para eliminar os efeitos negativos observados em imunoterapias, estes anticorpos geralmente passam por um processo de humanização (KOHLE & MILSTEIN 1975; MARANHÃO 2000).

A utilização de galinhas para a produção de anticorpos terapêuticos é uma opção considerável, pois numerosos alvos com grande potencial clínico que

despertam tolerância imunológica em mamíferos são imunogênicos em espécies não mamíferas, como as aves (SONG *et al.* 1985).

As aves possuem uma série de particularidades em seu sistema imunológico, as quais as diferenciam de mamíferos, sob o ponto de vista anatômico e funcional. Estas características próprias incluem estruturas especializadas, ligadas à formação e amadurecimento do sistema imunológico e suas células - como o Timo e a Bursa de Fabricius - e estruturas menos complexas, porém responsáveis por níveis mais primários de defesa, como as penas e pele. BUTCHER & MILES (2003) classificam estes órgãos e estruturas como componentes de resposta imunológica específica ou inespecífica, de acordo com seu modo de atuação. As denominações natural e adquirida ou inata e adaptativa também são utilizadas (MORGULIS 2002). Os órgãos do sistema imunológico das aves podem ser classificados em: primários – encarregados da formação e diferenciação das células deste sistema (timo e bursa de Fabricius); e secundários - órgãos para os quais estas células migram ou onde se agrupam, formando sítios de amadurecimento/diferenciação e atuação: glândula de Harder, baço, tonsilas cecais, placas de Peyer.

A Bursa de Fabricius (BF) é, provavelmente, a diferença anatômica/estrutural mais marcante do sistema imunológico das aves. Esta estrutura desempenha papel fundamental no processo de amadurecimento e diferenciação dos linfócitos B (papel desempenhado pela medula óssea em mamíferos e camundongos).

Os linfócitos das aves são classificados em células T e B (linfócitos “pequenos”) e células NK (*Natural Killer*). Estas células são morfológicamente muito semelhantes às dos mamíferos (MORGULIS 2002). Agentes como o vírus de Gumboro ou determinadas substâncias químicas podem causar a depleção das células precursoras dos linfócitos B, comprometendo a resposta imunológica humoral em galinhas (SHEELA *et al.* 2003). A BF é também sítio de ocorrência do fenômeno de conversão gênica, um processo de recombinação homóloga que confere aos linfócitos B uma maior capacidade de diversificação na decodificação de moléculas de anticorpos (MORGULIS 2002). O desenvolvimento das células B em galinhas pode ser dividido em três estágios: pré-bursal, bursal e pós-bursal. Inicialmente, células embrionárias produzidas no fígado, no saco vitelínico e na

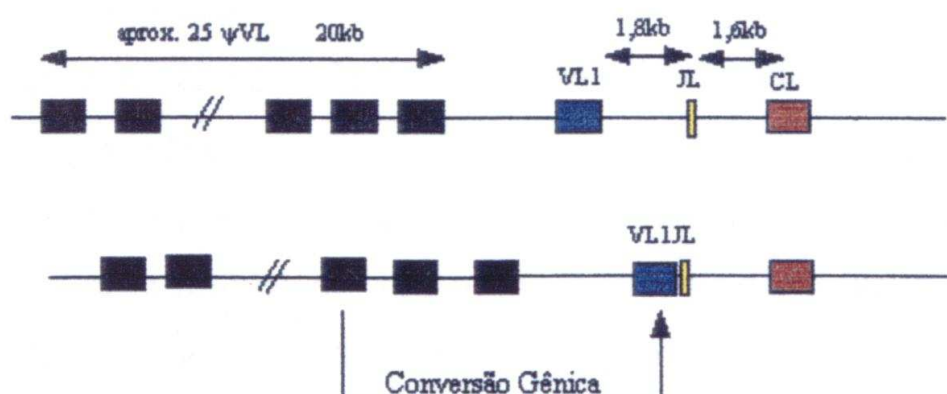
medula óssea, migram para a BF, local onde sofrem diferenciação até o vigésimo dia e, ao fim deste período, 90% das células aprestam-se como linfócitos B diferenciados. Depois de quatro semanas da eclosão do ovo, a bursa involui e perde a capacidade de gerar células B (WELL & REYNAUD 1987, citado por MARANHÃO 2001; BUTCHER & MILES, 2003).

Os loci de imunoglobulinas de galinhas ocorrem como exposto a seguir, e podem ser visto na figura 3. A região variável da cadeia leve (VL) dos anticorpos é formada pelos segmentos gênicos V_L1 e J_L distribuídos no *locus* clg_L . Já a região variável da cadeia pesada (VH) é codificada pelos segmentos V_H1 , D e J_H , que se distribuem no *locus* clg_H . Tanto para cadeia leve quanto para cadeia pesada de IgY, é observado apenas um segmento V funcional (V_L1 e V_H1 , respectivamente). Grupos de pseudogenes ψV (ψV_H para o *locus* clg_H e ψV_L para o *locus* clg_L) são encontrados anteriormente aos segmentos V funcionais. Há 25 segmentos ψV_L , os quais ocupam cerca de 20kb no genoma da galinha. Após 1,8kb do segmento V_L1 , encontra-se o único segmento J_L e, na sequência, o domínio constante lambda (C_λ) pode ser encontrado após 1,6 kb do J_L (MARANHÃO 2001).

A organização do *locus* clg_L é semelhante ao clg_H , porém, neste podem ser encontrados 80 pseudogenes ψV_H localizados a 80kb antes do segmento funcional V_H1 . Um número de 16 segmentos D ocorre na região 3', após o domínio funcional V_H1 e são distribuídos em aproximadamente 15kb. O único segmento J_H do *locus* da cadeia pesada localiza-se em seguida aos segmentos D e em seqüência encontra-se o segmento constante μ , com uma distância aproximada de 22kb do segmento J_H (MARANHÃO 2001). Os segmentos ψV são considerados pseudogenes por não codificarem proteínas funcionais, representam seqüências homólogas a segmentos V com menos de 100 pb.

A montagem do gene codificador dá-se pelo processo de recombinação gênica, que consiste em rearranjos envolvendo o único segmento V funcional de ambos *loci*.

(A) *locus* da cadeia leve de galinha



(B) *locus* da cadeia pesada de galinha

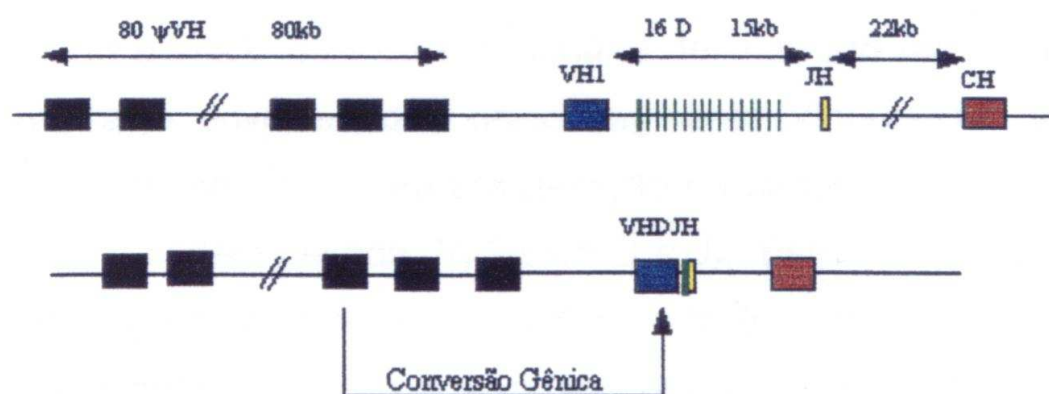


Figura 3. Organização dos *locus* de imunoglobulina de galinhas. (A) *locus* da cadeia leve mostrando cerca de 25 pseudogenes (quadrados pretos); VL (azul) - único segmento funcional; JL (amarelo)- um segmento de junção; CL(vermelho) - segmento da cadeia constante. (B) *locus* da cadeia pesada mostrando cerca de 80 pseudogenes (quadrados pretos); VH (azul) - único segmento funcional; D (verde) - exclusivos da cadeia pesada; JH (amarelo); CH (vermelho) - segmento da cadeia constante. (MARANHÃO 2001).

A recombinação ocorre num período curto (do 10º ao 15º dias de vida embrionária) e não é observada após a eclosão do ovo. Para gerar cadeia leve, V_L1 é rearranjado com J_L e para cadeia pesada, V_H1 com D e J_H . A diversidade gerada pelo rearranjo é limitada devido ao fato de haver apenas um segmento gênico V e um J para cada uma das cadeias, sendo criadas neste processamento o máximo de 2×10^4 combinações diferentes (ARAKAWA *et al.* 1996).

Após a recombinação, inicia-se o processo de conversão gênica que reforça a capacidade das aves de produzirem uma grande multiplicidade de

anticorpos. Estudos feitos com a utilização de roedores revelaram que os mamíferos utilizam outras rotas para a obtenção desta variabilidade (MORGULIS 2002). A conversão gênica tem início após 18 dias de desenvolvimento embrionário e segue após eclosão do ovo, ocorrendo também nos órgãos linfóides secundários (baço e linfonodos). Este mecanismo se dá por substituição do material genético dos segmentos rearranjados por pseudogenes V (V_L1 , V_H1).

Os genes de galinhas rearranjados e posteriormente convertidos sofrem ainda o processo de hipermutação somática (semelhante ao humano). Como resultado, são frequentemente observadas mutações ao longo dos CDR e arcaboloços (*Frameworks*).

Em síntese, a conversão gênica é o principal processo gerador de diversidade para as imunoglobulinas de aves, especialmente galinhas, enquanto nos mamíferos a variabilidade é determinada principalmente por rearranjo (MEHR *et al.* 2004).

As imunoglobulinas das aves são divididas em três diferentes tipos: IgA, IgM e IgG. A IgG das aves (IgY) possui maior massa molecular que seu correspondente em mamíferos e possui algumas características próprias. Atualmente, muitos pesquisadores utilizam as IgGs presentes na gema do ovo embrionado para a produção de anticorpos policlonais, utilizados em pesquisa médica. O volume de IgG obtida de um único ovo é muito maior do que aquele possível de ser obtido do soro de coelhos ou outras cobaias em uma semana de colheitas (CHUI *et al.* 2004).

As imunoglobulinas surgem em média 4 a 5 dias após a exposição do sistema imunológico ao antígeno. Sua duração no organismo é variável, sendo mais fugaz para as IgM's (cerca de 10 a 12 dias) e mais persistente para as IgG's (de 20 a 25 dias). As IgAs são responsáveis pela imunidade "local", estando presentes nas mucosas e secreções. As IgG's são as imunoglobulinas mais importantes para o sistema imunológico e para a monitoria de seu "status", já que a maioria dos testes laboratoriais busca quantificar esta classe de moléculas (BUTCHER & MILES 2003).

10. Fragmentos de anticorpos

Um fator importante na produção de soros antiofídicos é o isolamento das partes biologicamente ativas nas moléculas do anticorpo. A partir do sangue de animais imunizados, é separado o plasma, que possui não somente os anticorpos que se deseja, mas também outras proteínas, tais como fibrinogênio, albumina, alfa e betas globulinas (AGUIAR 1996). A purificação do plasma visa diminuir proteínas inespecíficas, deixando no soro apenas o anticorpo ou a porção deste responsável pela neutralização do antígeno. Em seguida, o fragmento Fc é removido do anticorpo: enzimas proteolíticas podem clivar as moléculas de imunoglobulinas e produzir fragmentos funcionais. A papaína, por exemplo, cliva a molécula IgG na região de dobradiça e libera três fragmentos: dois FAB (fragmento de ligação ao antígeno) e um Fc (fragmentos cristalizável). Já a pepsina degrada o fragmento Fc e libera dois Fab ligados ($(F(ab)_2)$) (Figura 4).

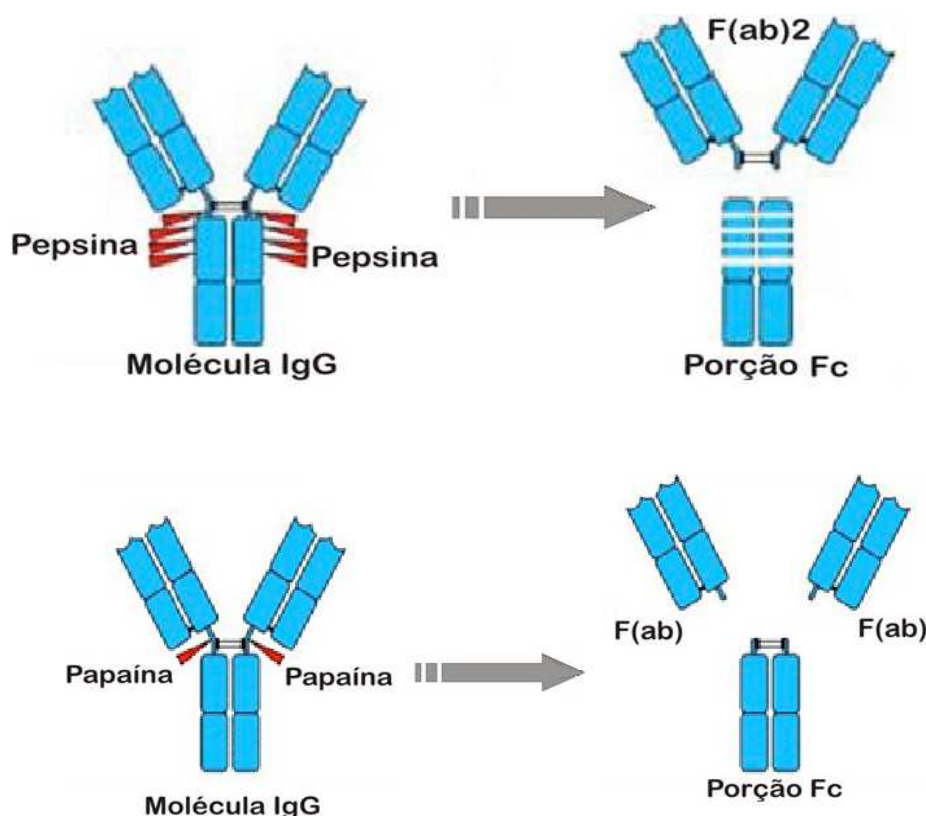


Figura 4. Molécula de imunoglobulina e seus fragmentos após a clivagem com pepsina e papaína. (adaptado do LIVRO ANIMAIS PEÇONHENTOS DO BRASIL – 2003).

Estes fragmentos podem ser utilizados como agentes terapêuticos, pois seus paratopos não são afetados pela clivagem proteolítica, e a ausência do fragmento Fc heterólogo ao organismo humano contribui para minimizar os efeitos indesejáveis neste tipo de tratamento (HOLLIGER & HUDSON 2005). Assim, na preparação de soros antiofídicos brasileiros, um dos passos é a remoção dos fragmentos Fc dos anticorpos de cavalos.

O desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante criou à possibilidade de produzir fragmentos funcionais de anticorpos. Os métodos, denominados engenharia de anticorpos, são baseados na manipulação das seqüências codificadoras dos fragmentos, e possibilitam gerar diversas combinações funcionais destes, as quais apresentam grande potencial clínico.

Dos fragmentos de anticorpos mais utilizados neste tipo de metodologia, enfatiza-se o scFv (*single-chain variable fragment* - fragmento variável de cadeia única), que consiste em um polipeptídeo mimético da região Fv do anticorpo; sua constituição é representada pela união do segmento VH ao VL por um *linker* polipeptídico flexível [(Gly₄Ser)₃, por exemplo] responsável pela estabilidade da molécula (Figura 5).

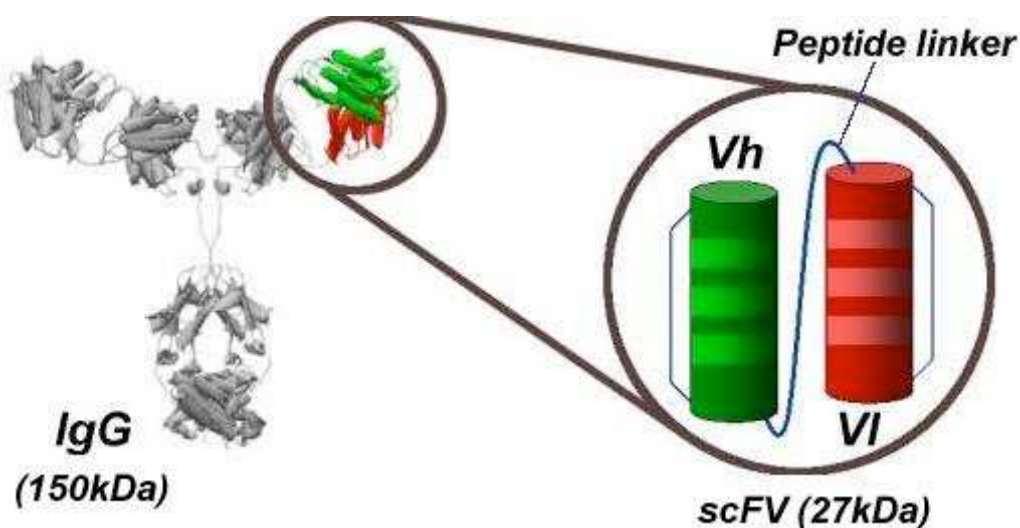


Figura 5. Representação esquemática do fragmento scFv. Os domínios VH e VL presentes na molécula scFv aparecem nas cores verde e vermelho, respectivamente. O polipeptídeo (linker) estabilizador dos domínios está indicado acima. As massas moleculares da IgG e de seu scFv derivado estão em destaque.

Existe também a possibilidade de sintetizar fragmentos contendo duas moléculas de scFvs iguais, ou diferentes (scFv-biespecífico), ou ainda três cadeias VHs ligadas a três VLs conjugadas (triabodies), dentre outras combinações distintas (Figura 6) (HOLLIGER & HUDSON 2005).

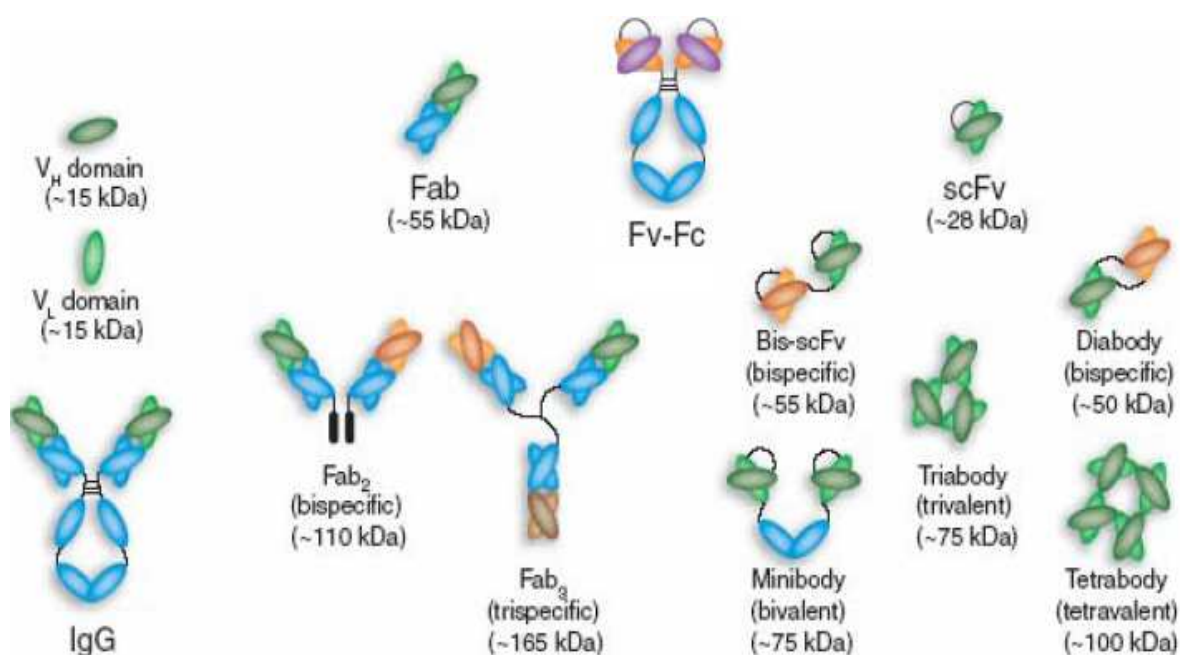


Figura 6. Representação esquemática de diferentes fragmentos de anticorpos. Uma molécula IgG é mostrada e também uma variedade de fragmentos de anticorpos, incluindo scFv, Fab, Bis-scFv, diabodies, triabodies, tetrabodies e múltiplos de Fab conjugados quimicamente (adaptado de HOLLIGER & HUDSON 2005).

Algumas características favoráveis à obtenção destes fragmentos recombinantes estão nos seguintes fatores: apresentam enovelamento correto em sistemas de expressão eucarióticos; são relativamente estáveis em suas conformações; os paratopos destas moléculas possuem atividade biológica específica contra os antígenos, a qual é compatível com a resposta observada nos anticorpos inteiros (HOLLIGER & HUDSON 2005).

O primeiro anticorpo murino aprovado oficialmente pelo FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) para uso em terapia humana foi o Orthoclone OKT3 anti-CD3, utilizado no tratamento de rejeição aguda em transplantes de rins, coração e fígado (MORO & RODRIGUES 2001; LI *et al.* 2005). A partir deste fato, ocorrido em 1986, houve um crescimento exacerbado nas pesquisas e indústrias voltadas para a produção e desenvolvimento de anticorpos. Além disto, algumas

estratégias foram criadas para tornar estes anticorpos compatíveis ao organismo humano (MARANHÃO *et al.* 2000).

Atualmente, existe uma série de anticorpos e fragmentos de anticorpos aprovados (ou em testes) pelo FDA para uso terapêutico humano, sendo que a maioria destinada às aplicações clínicas tem origem na engenharia genética. Como exemplos, citamos moléculas Fabs, scFvs, anticorpos quiméricos cujas regiões constantes do animal são substituídas pelas homólogas de origem humana, e ainda os denominados humanizados (*human-like*), com uma pequena fração animal (Tabelas 2 e 3) (CO & QUEEN 1991; KIM *et al.* 2005; MARANHÃO *et al.* 2000; HOLLIGER & HUDSON 2005).

Tabela 2 - Fragmentos de anticorpos Fab aprovados (ou em testes) nos EUA para uso terapêutico.

Tipo de fragmento/ fonte	Nome (genérico)	Molécula alvo	Indicação	Web site
Fab/ quimérico	ReoPro (abciximab)	GpIIb/gpIIIa	Doenças cardiovasculares	http://www.lilly.com/
Fab/ ovino	CroFab	Peçonha de serpente	Rattlesnake bite (antídoto)	http://www.savagelabs.com/
Fab/ ovino	DigiFab	Digoxina	Overdose com digoxina	http://www.savagelabs.com/
Fab/ ovino	Digibind	Digoxina	Overdose com digoxina	http://www.gsk.com/
Fab/ camundongo	CEA-scan (arcitumomab)	CEA	Câncer colorretal	http://www.immunomedics.com/
Fab / humanizado	Lucentis (ranibizumab; Rhu-Fab)	VEGF	Degeneração macular	http://www.gene.com/
Fab/ humanizado	Thromboview	D-dimer	Trombose venosa	http://www.agenix.com/
Fab/ humanizado	CDP791	VEGF	Anti-angiogenesis	http://www.nektar.com
Fab/ humanizado	CDP870	TNF- α	Doença de Crohn	http://www.nektar.com
Fab/ humanizado	MDX-H210	Her2/Neu & CD64 (YFcR1)	Câncer de mama	http://www.medarex.com/

Adaptado de HOLLIGER & HUDSON (2005).

Tabela 3 - Fragmentos de anticorpos scFv e derivados aprovados (ou em testes) nos EUA para uso terapêutico.

Tipo de fragmento/ fonte	Nome (genérico)	Molécula alvo	Indicação	Web site
scFv/ humanizado	Pexelizumab	Complemento C5	Revascularização	http://www.alexionpharmaceuticals.com/
(scFv) ₄ / camundongo	CC49	TAG-72	Tumores gastrointestinais	-
scFv / humano	SGN-17	P97	Melanoma	http://www.seagen.com/
scFv / humano	F5 scFv-PEG	Her2	Câncer de mama	-
Diabody (V _H -V _L) ₂ /humano	C6.5K-A	Her2/Neu	Canceres de mama e de ovário	-
Diabody (V _H -V _L) ₂ humano	L19 L19- γ IFN	EDB	Diagnostico: antiangiogenesis e placas artereoscleróticas	-
Diabody (V _L -V _H) ₂ humano	T84.66	CEA	Diagnóstico: câncer colorretal	-
Minibody (scFv-C _H 3) ₂ / quimérico	T84.66	CEA	Câncer colorretal	-
Minibody quimérico	10H8	Her2	Canceres de mama e de ovário	-
(scFv) ₂ -Fc / quimérico	T84.66	CEA	Câncer colorretal	-
scFv Biespecífico / camundongo	r28M	CD28 e MAP	Melanoma (antígeno MAP)	-
scFv Biespecífico / desconhecida	BiTE MT103	CD19 e CD3	Linfoma e leucemia	http://www.micromet.de/
scFv Biespecífico / desconhecida	BiTE	Ep-CAM e CD3	Câncer colorretal	http://www.micromet.de/
Diabody Biespecífico / camundongo	Tandab	CD19 & CD3	Linfoma e leucemia	www.affimed.de
Diabody /humano	Anti-TNF α dAb	TNF α	Artrite reumatóide e doença de Crohn	http://www.domantis.com/ , http://www.peptech.com/
VhH/ camelídeos	Nanobody	TNF α	Artrite reumatóide e doença de Crohn	http://www.ablynx.com/
VhH/ camelídeos	Nanobody	Fator de Von Willebrand	Antitrombótico	-

Adaptado de HOLLIGER & HUDSON (2005).

O tamanho reduzido e ausência da região Fc imprimem algumas vantagens às moléculas Fab e scFvs, dentre as quais, estão o alto poder de penetrabilidade em tecidos, o fato de não despertarem respostas efectoras do sistema imune, pois possuem imunogenicidade diminuída e podem ser eliminadas rapidamente da circulação sanguínea dos pacientes (HOLLIGER & HUDSON 2005). Estas são características desejáveis a anticorpos presentes no anti-soro utilizado em tratamento de intoxicações com peçonhas animais.

Em geral, anticorpos para aplicação terapêutica são desenvolvidos por meio da técnica de hibridoma, ou engenharia genética pela construção de bibliotecas de expressão em fagos (*Phage display*) e também por técnicas que utilizam modelos animais, como, por exemplo, camundongos transgênicos (KIPRIYANOV 2004).

11. Bibliotecas combinatoriais de anticorpos apresentados em fagos filamentosos: *Phage Display libraries*

Em 1985, Smith expressou a enzima de restrição *Eco RI* ligada a proteína três (pIII) de um bacteriófago. Com este trabalho, ele introduziu a metodologia denominada *Phage display*, a qual tem por base a expressão de peptídeos ou proteínas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante permanece no genoma viral (AZZAZY & HIGHSMITH 2002). Deste modo, é possível estudar a correlação entre fenótipo expresso e sua sequência de DNA (fenótipo x genótipo) (ADDA *et al.* 2002).

Tipicamente, utilizam-se bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1) (SIDHU 2001), vírus bacteriófagos filamentosos que parasitam bactérias Gram-negativas que por sua vez apresentam pilus F. O vírus aproveita a maquinária de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Em geral, o bacteriófago M13 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). Vírus de eucariotos, tais como baculovírus, também podem ser utilizados neste processo (BOUBLIK *et al.* 1995).

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). 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. 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 polipeptídeos (PHIZICKY & FIELDS 1995).

Em 1990, foram obtidos os primeiros fragmentos de anticorpos expressos em fagos (MCCAFFERTY *et al.* 1990). Normalmente, bibliotecas combinatórias de anticorpos são sintetizadas a partir da construção de genes dos fragmentos de anticorpos recombinantes na forma de scFv ou Fab; em seguida, estes genes são introduzidos por manipulação genética em plasmídios fusionados ao gene codificador de uma proteína capsídica (Figura 7). No caso de bibliotecas, são utilizados genes codificantes para milhões de fragmentos distintos.

Os fagomídeos representam uma alternativa prática ao uso e manipulação do DNA viral para expressão de anticorpos recombinantes. Fagomídeos são plasmídeos que possuem: origem de replicação bacteriana (*E. coli*); origem de replicação viral; gene de fusão (*pIII* ou *pVIII*); sítio de inserção do fragmento codificante do anticorpo ou qualquer outra proteína de interesse; e genes de resistência a antibióticos para seleção em meio apropriado (Figura 7). Como os fagomídeos não possuem todos os genes das proteínas necessárias para o encapsidamento da partícula viral, fagos auxiliares (*helper*) contendo todos os genes dos bacteriófagos filamentosos são utilizados nas culturas de células transformadas com o fagomídeo, permitindo o resgate da partícula viral (BRÍGIDO & MARANHÃO 2002). Durante a infecção viral, o DNA proveniente dos fagomídeos é preferencialmente revestido pelas proteínas estruturais, pois os fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação, dificultando sua

reprodução e empacotamento de seu próprio material genético (BARBAS *et al.* 2001).

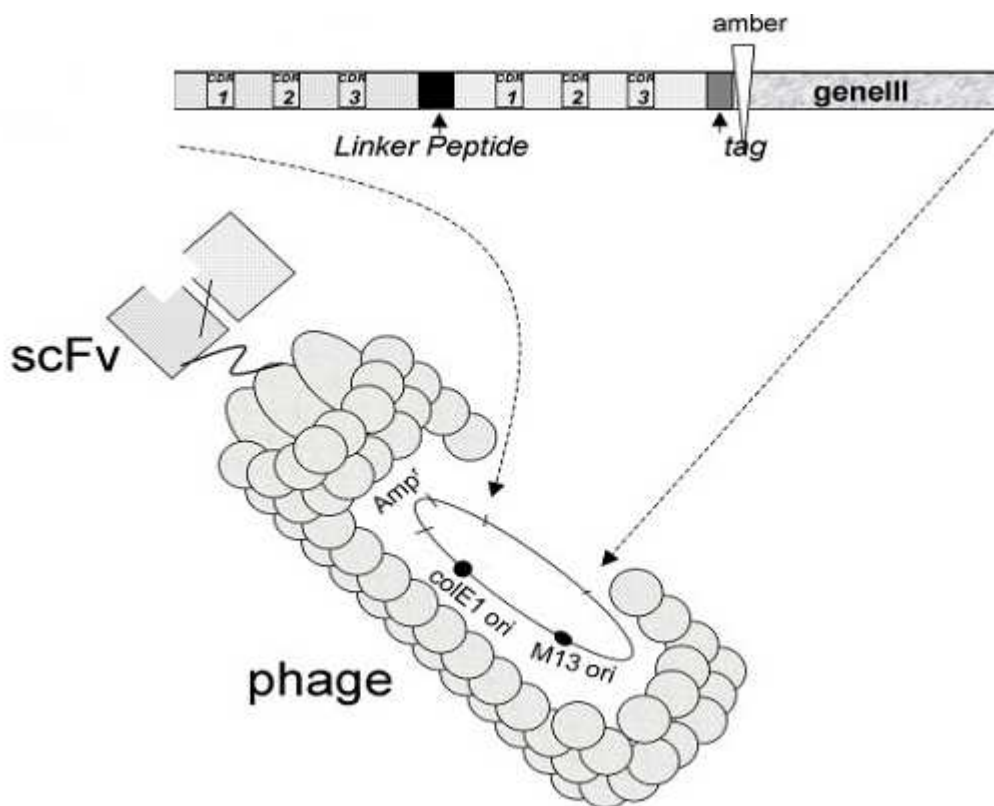


Figura 7. Representação esquemática de uma molécula scFv fusioanada a PIII do fago filamentoso. São mostrados: o fago ligado ao scFv, genoma do fago (fagomídio) contendo o gene de resistência a ampicilina (Amp^r), origem de replicação para *E. coli* (colE1 ori) e origem de replicação para M13 (M13 ori); O gene 3 ligado ao DNA codificante das CDRs das cadeias leve e pesada unidas por um linker (VILLANI *et al.* 2008).

Anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de seqüência baseada em sua afinidade de ligação a uma molécula alvo (antígeno) por um processo de seleção *in vitro* (PARMLEY & SMITH 1988). Em um ciclo de seleção, as moléculas alvo são imobilizadas em um suporte sólido, geralmente uma placa de microtitulação, mas também se utilizam “beads”, resinas ou membranas; a seguir, a biblioteca de anticorpos em solução é incubada com a molécula alvo. Os fagos contendo anticorpos 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 (amplificados em *Escherichia coli*). Os fagos resultantes

deste processo são titulados e submetidos a uma nova seleção (ligação ao alvo, eluição e amplificação), visando obter anticorpos mais específicos ao alvo. Após três ou quatro repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas seqüências de DNA podem ser obtidas por seqüenciamento (BARBAS *et al.* 2001).

Para construção de uma biblioteca combinatória de anticorpos, é necessária a obtenção de genes rearranjados codificadores das cadeias variáveis pesadas e leves. Estes genes podem ser sintetizados por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) e RT-PCR (transcrição reversa - PCR), realizadas a partir de mRNAs extraídos de animais ou humanos. A fonte humana apresenta limitações, já que está restrita a indivíduos doentes ou vacinados com o antígeno. Quanto à utilização de animais, são possíveis imunizações com antígenos específicos. No caso de peçonhas, vários animais como cavalos, burros, ovelhas, cabras, cães, coelhos e até mesmo galinhas já foram utilizados para a produção de soros antitoxinas. Os efeitos tóxicos e letais de peçonhas produzidas por serpentes brasileiras são neutralizados por anticorpos produzidos por galinhas (ALMEIDA *et al.* 1998), portanto estes anti-venenos podem ser utilizados no tratamento de ofidismo tanto animal quanto humano. Alguns estudos realizados sobre a produção em galinhas de anti-venenos de serpentes e escorpiões mostram a capacidade neutralizante destas imunoglobulinas por testes *in vivo* (THALLAY & CARROLL 1990).

12. Utilização de bibliotecas de anticorpos na identificação de anticorpos neutralizantes de toxinas animais

Moléculas scFvs e Fabs mostram-se efetivas em neutralizar as ações dos principais componentes tóxicos presentes em peçonhas de escorpiões (MOUSLI *et al.* 1998; LICE *et al.* 1996; MOUSLI *et al.* 1999; AUBREY *et al.* 2004; SELISKO *et al.* 2004; JUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.* 2005), aranha *Latrodectus mactans* (viúva negra) (BUGLI *et al.* 2008), vespa (DOBROVOLSKAIA *et al.* 2004) e serpente. Neste último caso, destacamos a neutralização de fosfolipases tóxicas da peçonha de *Bothrops jararacussu* por moléculas scFvs, as quais foram derivadas de uma biblioteca de anticorpos humanos denominada Griffin.1 (TAMAROZZI *et al.* 2006). A possibilidade de obter anticorpos passíveis de utilização como anti-

venenos é concretizada pela técnica de *Phage Display*. No presente estudo, foi construída uma biblioteca scFv de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *B. pauloensis*, desta biblioteca foi selecionado um anticorpo específico a toxinas presentes na peçonha bruta, o qual neutralizou a ação hemorrágica da peçonha, assim como a atividade fibrinogenolítica de uma mealoprotease não hemorrágica presente nesta peçonha (Neuwiedase).

13. Referências

ADRIS-WIDHOPF, J., RADER, C., STEINBERGER, P., FULLER, R., BARBAS, F., C. **Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display.** J. Imm. Meth.. v.242, p.159-181. 2000.

AGUIAR, A. S., C. R., ALVES, A. R., MELGAREJO, S., GIOVANNI-DE-SIMONE. **Purification and partial characterization of a thrombin-like/giroux enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom.** Toxicon, v.34, p.555-565, 1996.

ALMEIDA, C. M., KANASHIRO, M. M., RANGEL FILHO, F. B., MATA, M. F., KIPNIS, T. L., DIAS DA SILVA, W. **Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk.** Vet. Rec. v.143, n.21, p.579–584, 1998.

AMARAL, A. **A general consideration of snake poisoning and observations on Neo-tropical pitvipers.** Contribution to Harvard Institute of Tropical Biology. v. 2, p. 1-64, 1925.

ARAKAWA, H., FURUSAWA, S., EKIRO, S., YAMAGISHI, H. **Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal center.** Embo J. v.15, n.10, p.2540-2546. 1996.

AUBREY, N., MUZARD, J., PETER, J. C., ROCHATB, H., GOYFFON, M., DEVAUX, C., BILLIALD, P. **Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aa1, and functional evaluation versus other antibody fragments.** Toxicon. n.43, p.233–241, 2004.

BEGHINI, D. G., DA CRUZ-HOFLING, M. A, RANDAZZO-MOURA, P., RODRIGUES-SIMIONI, L., NOVELLO, J. C., HYSLOP, S., MARANGONI, S. **Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* venom.** Toxicon. v.46, n.6, p.604-11, 2005.

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.

BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. **Snake venom proteins action on hemostasis.** Biochimie, v.82, p.851-859, 2000.

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

BUGLI, F., GRAFFEO, R., STERBINI, F. P., TORELLI, R., MASUCCI, L., SALI, M., GRASSO, A., RUFINI, S., RICCID, E., FADDA, G., PESCATORI, M. **Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice**. *Toxicon* v.51, p.547–554, 2008.

BUTCHER, G. D., MILES, R. D. **Avian immune system**. *Veterinary Medicine – Large Animals Clinical Sciences* Departament, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. VM74, 2003.

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.* 2004.

CALMETTE, A. **Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation**. *Ann. Int. Pasteur.* p. 257-91, 1894.

CAMEY, K. U., VELARDE, D. T., SANCHEZ, E. F. **Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of *Bothropic* antivenom in Brazil**. *Toxicon*. n.40, p.501-509, 2002.

CARDOSO, J., L.C. **Ofídios – *Bothrops* (jararaca, cruzeira)**. 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.

CO, M. S., QUEEN, C. **Humanized antibodies for therapy**. *Nature*. n.351, p.501-502, 1991.

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

DOBROVOLSKAIA, E. N., GAM, A., SLATER, J. E. **Generation of Mono-specific Recombinant Antibody Fragments From Chicken to Allergenic Proteins Fel d 1, Amb a 1 and Whole Yellow Jacket Venom**. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.113, n.2, p.227, 2004.

FOX J. W., SERRANO S. M. **Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity.** FEBS J. v.275, p.3016-3030, 2008.

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.

FRANÇA, F. O. S. & MÁLAQUE, C. M. S. **Acidente Botrópico.** In: CARDOSO, J. L. C, FRANÇA, F. O. S., FAN, H. W., MÁLAQUE, C. M. S., HADDAD, JR. **org. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1 ed. v.1, p. 72-86, Sarvier, São Paulo, 2003.

GOMIS-RÜTH, F. X. **Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases.** Mol. Biotechnol. v.24, p.157-202, 2003.

GRASSET, E., PONGRATZ, E., BRECHBUHLER, T. **Analyse immunochimique des constituants des venis de serpents par la methode de precipitation en milieu gelifie.** Ann. Inst. Pasteur. v. 91, p.162-186, 1956.

GUTIÉRREZ, J. M. **Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms.** Mem. Inst. Butantan v.52(supl.), p.37-38, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, R. **Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms.** A review. Mem. Inst. Butantan v.51, p. 211-223, 1989.

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

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

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.

HAWGOOD, B. J. **Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950).** Toxicon v.30, p. 573-579, 1992.

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., HUDSON, P. J. **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** Nature Biotechnol. v.23,p.1126-1136, 2005.

HON – Health on Net. **Doenças Auto-Imunes** [on line] 2008 [capturado 08 jun. 208] Disponível em: http://129.195.254.71/cgi-bin/HONselect_pt?browse+C20.111

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

ITOH, N., TANAKA, N., FUNAKOSHI, I., KAWASAKI, T., MIHASHI, S., YAMASHINA, I. **Organization of the Gene of Batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme**. J. Biol. Chem. v. 263, n. 16, p. 7628-7631, 1988.

IWANAGA, S., SUZUKI, T. **Enzymes in snake venom**. In: **Snake Venom**, p.61-158, ed. lee, Berlim, 1979

JÄGER, D. & KNUTH, A., **Antibodies and vaccines–hope or illusion? The Breast**. v.14, n.6, p.631-635, 2005.

JUAREZ-GONZALEZ, V. R., RIANO-UMBARILA, L., QUINTERO-HERNANDEZ, V., OLAMENDI-PORTUGAL, T., ORTIZ-LEON, M., ORTIZ, E., POSSANI, L. D., BECERRIL, B. **Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2**. J. Mol. Biol. v.346, p.1287–1297, 2005.

KAMIGUTI A., S., HAY, C. R. M., ZUZEL, M. **Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2b1$ -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.

KIM, S. J., PARK, Y., HONG, H. J. **Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies**. Molecules and Cells v. 20, n.1, p.17-29, 2005.

KINI, R.M. **Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes**. Toxicon v. 42, p.827-840, 2003.

KIPRIYANOV, S., LE GALL, F. **Generation and Production of Engineered Antibodies**. Molecular Biotechnology v. 26, p.39-60, 2004.

KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity**. Nature v.256, p.495 - 497, 1975.

LICE, A. F., BECERRIL, B., POSSANI, L. D. **FAB fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius hoffmann***. Toxicon v.34, n.8, p.843-847, 1996.

MANDELBAUM, F. R., ASSAKURA, M. T., REICHL, A. P., **Characterization of two hemorrhagic factor and proteases isolated from the venom of three**

species of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). Toxicon v.22, p.193-196, 1984.

MANDELBAUM, F. R., SERRANO, S. M., SAKURADA, J. K., RANGEL, H. A., ASSAKURA, M. T. **Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the *Crotalinae* and *Viperidae* subfamilies.** Toxicon. v.27, p.169-177, 1989.

MARKLAND , F. S. (1) **Snake venoms and the hemostatic system.** Toxicon v.30, n.12, p.1749-800, 1998.

MARKLAND, F. S. (2) **Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory.** Thromb. Haemost. v.79, n.3, p.668-674,1998.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. **Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis.** Biochim. Biophys. Acta v. 1477, p. 146-156, 2000.

MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A. D., WINTER, G., CHISWELL, D. J. **Phage antibodies filamentous phage displaying antibody variable domains.** Nature v.348, p.552–554, 1990.

MÉNEZ, A. **Molecular immunology of snake toxins.** Pharmac. Ther. v.30, p.91-113, 1985.

MEHR, R., EDELMAN, H., SEHGAL, D., MAGE, R. **Analysis of mutational lineage trees from sites of primary and secondary ig gene diversification in rabbits and chickens.** J. Immun. v.172, p.4790-4796, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos,** Fundação Nacional de Saúde (1999).

MORGULIS, M.S. **Imunologia aplicada.** In: MACARI, M. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.** cap. 18, p.231-245, 2002.

MORO, A. M., RODRIGUES, M. T. A. **Anticorpos Monoclonais para a Clínica.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento n.22, p.32-35, 2001.

MOUSLI, M., DEVAUX, C., ROCHAT, H, GOYON, M., BILLIALD, P. **A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*.** FEBS Letters v.442, p.183-188, 1999.

MOUSLI, M., GOYJON, M., BILLIALD, P. **Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis***. Bioch. Bioph. Acta v.1425, p.348-360, 1998.

NIEMIAROWSKI, S., MCLANE, M. A., KLOCZEWIAK, M., STEWART, G.J. **Disintegrins and other naturally occurring antaonists of platelet fibrinogen receptor**. Sem. Hematol. v.31, p. 289-300, 1994.

NOBELPREIS. **O Prêmio Nobel**. [on line] 2008 [capturado em 05 Maio de 2008] Disponível em URL: <http://www.nobelpreis.org/portugues>

OSHIMA-FRANCO, Y., LEITE, G. B., SILVA, G. H., CARDOSO, D. F., HYSLOP, S., GIGLIO, JR. D. A, CRUZ-HOFLING, M. A., RODRIGUES-SIMIONI, L. **Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacucu) venom by crotoxin antiserum and heparin**. Toxicon. v.39, n.10, p.1477-85, 2001.

PHISALIX, M. & BERTRAND, G. **Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère**. C. R. Soc. Biol. p.111-15, 1894.

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., MARCUSSI, S., CAMBRAIA R. S., ARAÚJO, A. L., MALTA-NETO, N. R., HAMAGUCHI, A., FERRO, E. A. V., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R., SOARES, A. M. **Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom**. Toxicon v.44, p.305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M., SOARES, A. M., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., FRANCESCHI, A. M., RUCAVADO, 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**. Arch. Biochem. Biophys. v.381, p.213–224, 2000.

RODRIGUES, V. M., SOARES, A. M., MANCIN, A.C., FONTES, M. R. M., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R. **Geographic variations in the composition composition of myotoxins from bothrops neuwiedi snake venoms: biochemical characterization and biological activity**. Comp. Biochem. Phys.. v.121, p.215-222, 1998.

RODRIGUES, R. S., IZIDORO, L. F. M., TEIXEIRA, S. S., SILVEIRA, L. B., HAMAGUCHI, A., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., GIGLIO, J. R., FULY, A. L., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M. **Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom.** Toxicon v.50, p.153-165, 2007.

ROODT, A. R., DOLAB, J. A., FERNANDEZ, T., SEGRE, L., HAJOS, S. E. **Crossreactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina.** Toxicon v.36, p.1025-38, 1998.

ROSENFELD, G. **Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América.** In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E.E., DEULOFEU, V., **Venomous animals and their venoms.** p.354-841, New Yourk, ed. Academic Press, 1971.

SÁNCHEZ, E. E., RAMIREZ, M. S., GALÁN, J. A., LOPEZ, G., RODRIGUES-COSTA, A., PÉREZ, J.C. **Cross reactivity of three antivenoms against North American snake venoms.** Toxicon v.41, p.315-320, 2003.

SBH - **Sociedade Brasileira de Herpetologia** [on line]. Brasil. [capturado em 31 de maio de 2008] Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>

SELISKO, B., COSÍO, G., GARCÍA, C., BECERRIL, B., POSSANI, L. D., HORJALES, E. **Bacterial expression, purification and functional haracterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmann*.** Toxicon v.43, p.43–51, 2004.

SIDHU, S. S. **Engineering M13 for phage display.** Biomol. Eng. v.18, n.2, p.57-63, 2001.

SILVA, V. X. **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae).** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2000.

SILVERTON, E. W., NAVIA, M. A., DAVIES, D. R. **Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.. v.74, p.5140-5144, 1977.

SHEELA, R. R., BABU, U., MU, J., ELANKUMARAN, S., BAUTISTA, D. A., RAYBOURNE, R. B., HECKERT, R. A., SONG, W. **Immune responses against *Salmonella enterica* Seroovar Enteritidis infection in virally immunosupressed chickens.** Clin. Diag. Lab. Imm.. v.10, p.670-679, 2003.

SONG, C. S., YU, J. H., BAI, D.H., HESTER, P. Y., KIM, K. H. **Antibodies to the alpha-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens.** J. Imm.. v. 135, p.3354-3359, 1985.

STÁBELI, R. G., MAGALHÃES, L. M. P., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., OLIVEIRA, E. B. **Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojeni* I-amino**

acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. *Toxicon* v.46, p308-317, 2005.

TAMAROZZI, M. B., SOARES, S. G., MARCUSSI, S., GIGLIO, J. R., BARBOSA, J. E. **Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom.** *Bioc. Bioph. Acta* v.1760, p.1450–1457, 2006.

THEAKSTON, R. D. G., REID, H. A. **Development of a simple assay procedure for the characterisation of snake venoms.** *Bull WHO.* v.61, p.949–956, 1983.

THEAKSTON, R. D., REID, H. A. **Enzyme-like immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency.** *Toxicon* n.17, p.511-515, 1979.

VILLANI, M. E., DI CARLI, M., DONINI, M., TRAVERSINI, G., LICO, C., FRANCONI, R., BENVENUTO, E., DESIDERIO, A. **Validation of a stable recombinant antibodies repertoire for the direct selection of functional intracellular reagents.** *J. Immunol. Methods.* v.239, p.11-20, 2008.

WAGSTAFF, S. C., LAING, G. D., THEAKSTON, R. D. G., PAPASPYRIDIS, C., HARRISON, R. A. **Bioinformatics and multi-epitope DNA immunization to design rational snake antivenom.** *PLOS Medicine*, v.3, n.6, 2006.

WARRELL, D. A. **Snake venoms in science and clinical medicine. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 83, p.732-40, 1989.

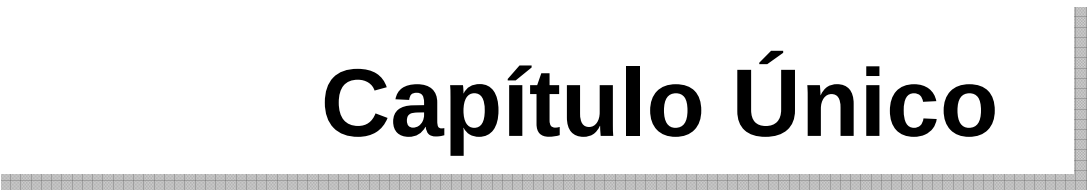
WISNER, A., BRAUD, S., BON, C., **Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom.** *Haemostasis* v.31, p.133-140, 2001.

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

WITHANAGE, G. S. K., KAISER, P., WIGLEY, P., POWERS, C., MASTROENI, P., BROOKS, H., BARROW, P., SMITH, A., MASKELL, D., MCCONNELL, I. **Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.** *Inf. Imm.* v.72, p.2152-2159, 2004.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Progress and Characterization of Venom and Standardization of Antivenoms.** WHO Offset Publication n.58, p.1-4, 1981.

Capítulo Único



1. Resumo

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 são os principais componentes de peçonhas botrópicas responsáveis por seus efeitos hemorrágicos. Neste estudo foi construída uma biblioteca de fragmentos de anticorpos recombinantes, derivados de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. A biblioteca foi utilizada para selecionar fagos expressando scFvs ligantes a toxinas presentes na peçonha, e para expressão, purificação e identificação de anticorpos capazes de inibir diversas atividades tóxicas causadas pela peçonhas de *B. pauloensis*. Por meio de ensaios biológicos e enzimáticos, constatou-se a capacidade da molécula scFv (C5) em inibir as ações hemorrágica e fibrinogenolítica da peçonha bruta e de uma metaloprotease isolada (Neuwiedase) da mesma peçonha.

Palavras-chave: *Phage display*, scFv, metaloprotease, peçonha botrópica, hemorragia.

2. Abstract

Metalloproteinases are hydrolytic endopeptidase-like enzymes that depend on the ligation of a metal ion, such as zinc, in the catalytic site for its activity. These enzymes are the main components of bothropic venoms that are responsible for the typical hemorrhagic effect. In this study, we have constructed a combinatorial library of scFv monoclonal antibodies derived from immunized chickens with crude venom of *Bothrops pauloensis*. The scFv library was screened for ligands to the toxins of the crude venom in order to identify antibodies that were able to inhibit the toxic activities caused by *B. pauloensis* venoms. Biological and enzymatic assays demonstrated that one scFv clone was able to inhibit the hemorrhagic and fibrinogenolytic activities of the crude venom and of an isolated metalloprotease (Neuwiedase).

Key words: *Phage display*, scFv, metalloprotease, bothropic venom, hemorrhagic.

3. Introdução

As peçonhas ofídicas são constituídas por uma variedade de toxinas distintas, no entanto, apenas dois grupos, as proteases e fosfolipases A₂, são as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos observados. Serinoproteases e metaloproteases são as duas principais classes de proteases. As metaloproteases de peçonhas botrópicas, compreendem uma série de enzimas “zinco dependentes” com diferentes massas moleculares que são responsáveis pelas hemorragias características do envenenamento (BJARNASON & FOX 1994).

Regiões imunogênicas e altamente conservadas destas toxinas podem induzir a formação de anticorpos, os quais são capazes de neutralizar as ações de várias toxinas diferentes da mesma peçonha, e de toxinas presentes em peçonhas distintas (HARRISON *et al.* 2003). Assim, alguns epítomos comuns as várias toxinas são responsáveis pela neutralização cruzada observada na ação de soros antiofídicos (ROODT *et al.* 1998).

Os soros antiofídicos são produzidos em animais, geralmente cavalos, utilizando-se à peçonha bruta como imunógeno associado com adjuvantes. Um fator importante na produção de soros antiofídicos é o isolamento das partes biologicamente ativas das moléculas do anticorpo, deixando apenas a porção responsável pela neutralização do antígeno. Desta forma, o fragmento Fc é removido: enzimas proteolíticas clivam moléculas IgGs e liberam os seguintes fragmentos: dois Fab (fragmento de ligação ao antígeno) ou um (Fab)₂ e um Fc (fragmentos cristalizável).

Por técnicas de DNA recombinante criou-se a possibilidade de produzir fragmentos funcionais de anticorpos. Combinações diversas destes fragmentos podem ser produzidas, as quais apresentam grande potencial clínico. Dos fragmentos de anticorpos mais utilizados neste tipo de metodologia, enfatiza-se o scFv, que consiste em um polipeptídio mimético na região Fv do anticorpo.

Moléculas scFvs e Fabs mostram-se efetivas em neutralizar as ações dos principais componentes tóxicos presentes em peçonhas de escorpiões (MOUSLI *et al.* 1998; LICE *et al.* 1996; MOUSLI *et al.* 1999; AUBREY *et al.* 2004; SELISKO *et al.* 2004; JUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.* 2005), aranha *Latrodectus mactans* (viúva negra) (BUGLI *et al.* 2008), vespa (DOBROVOLSKAIA *et al.* 2004) e serpente.

Neste último caso, destacamos a neutralização de fosfolipases tóxicas da peçonha de *Bothrops jararacussu* por moléculas scFvs, as quais foram derivadas de uma biblioteca de anticorpos humanos denominada Griffin.¹ (Tamarozzi *et al.* 2006). (TAMAROZZI *et al.* 2006).

Bibliotecas de fragmentos de anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de seqüência baseada em sua afinidade de ligação a uma molécula alvo (antígeno) por um processo de seleção *in vitro* (PARMLEY & SMITH, 1988). Contudo, para construir uma biblioteca combinatória de anticorpos, é necessária a obtenção de genes rearranjados codificadores das cadeias variáveis pesadas e leves. Estes genes podem ser sintetizados por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) e RT-PCR (transcrição reversa - PCR), realizadas a partir de mRNAs extraídos de animais ou humanos. A fonte humana apresenta limitações, já que está restrita a indivíduos doentes ou vacinados com o antígeno. Quanto à utilização de animais, são possíveis imunizações com antígenos específicos. No caso de peçonhas, vários animais como cavalos, burros, ovelhas, cabras, cães, coelhos e até mesmo galinhas já foram utilizados para a produção de soros antitoxinas.

Os efeitos tóxicos e letais de peçonhas produzidas por serpentes brasileiras são neutralizados por anticorpos produzidos por galinhas (ALMEIDA *et al.*, 1998). A possibilidade de obter fragmentos de anticorpos passíveis de utilização como anti-venenos é concretizada pela técnica de *Phage Display*.

No presente estudo, foi construída uma biblioteca scFv de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *B. pauloensis*, desta biblioteca foi selecionado um anticorpo específico a toxinas presentes na peçonha bruta, o qual neutralizou a ação hemorrágica da peçonha, assim como a atividade fibrinogenolítica de uma mealoпротеase não hemorrágica presente nesta peçonha (Neuwiedase).

4. Objetivo

Geral:

- Obtenção de anticorpos específicos anti-toxinas da peçonha de *B. pauloensis* a partir de uma biblioteca combinatorial scFv de galinha apresentada em fagos filamentosos com função neutralizante para suas atividades tóxicas.

Específico:

- Construção de uma biblioteca de anticorpos (scFv) apresentada em fagos (*Phage Display*) de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *B. pauloensis*.
- Avaliação da qualidade da biblioteca por análises da diversidade do repertório de anticorpos clonados.
- Seleção de moléculas scFvs ligantes a toxinas da peçonha de *B. pauloensis*;
- Caracterização dos anticorpos específicos scFv ligantes das toxinas da peçonha de *B. pauloensis*;
- Análises da ação neutralizante dos scFvs selecionados em relação as atividades tóxicas: hemorrágica, fosfolipásica indireta e miotóxica, da peçonha bruta *B. pauloensis*, e fibrinogenolítica da metaloprotease Neuwiedase.

5. Materiais e métodos

5.1. Linhagens bacterianas

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas durante a realização deste trabalho foram:

- **XL1-Blue** (STRATAGENE) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' ProAB lacI^q lacIqZ M15Tn10(Tet^R)*]. (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Essa linhagem foi utilizada na produção de partículas virais, transformação e amplificação de Fagomídeos.

- **Top 10** (INVITROGEN) F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str^R) endA1 nupG*.

Essa linhagem foi empregada na expressão de scFv em solução.

5.2. Plasmídeo

pComb3XSS -f(-) - 4,5 kb, promotores *plac*, *ori* ColE1, *ori* f1, *Amp^R*. Possui a seqüência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos 230 a 406). Apresenta ainda um códon de parada âmbar (TAG), não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E49) como a XL1-Blue ou ER2537, mas reconhecido por cepas de bactérias não supressoras como a TOP 10. Isto possibilita tanto a expressão de proteínas fusionadas à proteína PIII do fago, quanto proteínas de fusão livre da proteína III. Possui uma região com seis histidinas (H6), logo após o sítio de clonagem do gene, para purificação em coluna de níquel e uma região codificadora de resíduos que constituem o epítopo de uma hemaglutinina (HA) que possibilita a detecção do scFv com utilização de um anticorpo anti-HA (SCOTT; BARBAS 2000). Este plasmídeo foi obtido por doação da Profa. Dra. Andreia Queiroz Maranhão (UnB).

5.3. Bacteriófago auxiliar

VCSM13 – Derivado do bacteriófago M13 com o gene II mutado: origem de duplicação plasmidial derivada do p15 e gene de resistência à kanamicina. (STRATAGENE).

5.4. Meios de Cultura

Meio LB (*Luria Bertani*):

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
Ajustar o pH para 7,0	

Meio LB ágar:

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

Meio LB top ágar:

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 0,7% (p/v).

Meio SB (*Super Broth*):

Peptona de caseína	3,0% (p/v)
Extrato de levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)
Ajustar o pH para 7,0	

Meio SOB:

Peptona de caseína	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,05% (p/v)
KCl	0,00186% (p/v)
Ajustar o pH para 7,0	

Meio SOC:

Meio SOB	97 mL
Glicose 2M (filtrada)	1 mL
MgCl ₂ 1M (autoclavado)	1 mL
Mg SO ₄ (autoclavado)	1 mL

Todos os meios foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e conservados a temperatura ambiente até a utilização.

5.5. Antibióticos

Soluções estoques: Ampicilina 100 mg/mL

Carbenicilina 100 mg/mL

Kanamicina 50 mg/mL

Essas soluções foram preparadas em água mili Q, esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

Solução estoque: Tetraciclina (SIGMA) 20mg/ml

Essa solução foi preparada em etanol, esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

5.6. Soluções de uso geral

- **Glicose 20%**

Glicose anidra 20% (p/v)

- **Glicerol 50%**

Glicerol 50% (v/v)

Esta solução foi esterilizada por autoclavagem.

- **PEG-8000 (Polietileno Glicol) - Sigma**

- **Azida Sódica – (Sigma)**

- **Solução de MgCl₂ 1M**

MgCl₂.6H₂O 101,65 g

H₂O q.s.p. 500 mL

A solução foi autoclavada durante 20 minutos

- **IPTG (isopropil-β-D- thiogalactopyranoside) 1M**

IPTG (SIGMA) 0,238 g

Água mili Q 1 mL

A solução foi esterilizada por filtração em filtro MILLIPORE 0,2 μm e estocada a -20°C.

- **Solução de CaCl_2 50mM**

Esta solução foi preparada com água bidestilada autoclavada e, em seguida, filtrada com filtro MILLIPORE 0,2 μm .

5.7. Soluções utilizadas no procedimento de seleção da biblioteca

Todas as soluções utilizadas neste passo foram esterilizadas por filtração com membranas Millipore de 0,22 μm .

- **Tampão Bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,6**

Bicarbonato de sódio	420 mg
----------------------	--------

H_2O destilada	90 mL
--------------------------------	-------

O pH foi ajustado para 8,6

O volume final foi completado para 100 mL.

- **TBS 10X (estoque)**

Tris(hydroxymethyl)aminomethano	0,5 M
---------------------------------	-------

NaCl	1,5 M
------	-------

O pH foi ajustado para 7,4

- **TBS-BSA 1%**

TBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 1% (p/v)

- **TBS-BSA 3%**

TBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 3% (p/v)

- **TBST 0,5% (tampão de lavagem)**

TBS 1X adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) – Sigma

- **Tampão de eluição**

HCl	0,1M
-----	------

O pH foi ajustado para 2,2 com Glicina (Sigma).

- **Tampão de neutralização**

Tris-Base 2 M diluído em água.

5.8. Soluções para eletroforese em Gel Agarose e de Poliacrilamida

- **Tampão de corrida para gel de Agarose (TBE) 10X**

Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)

- **Tampão de amostra para Gel de Agarose 10X**

Tampão de corrida TBE 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)

- **Solução de Brometo de etídio 20.000X**

Brometo de etídio	10 mg/mL
-------------------	----------

- **Tampão de corrida para SDS-PAGE (5X)**

Tris base	125 mM
Glicina	125 mM
SDS	0,5
pH 9,2	

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 2X**

Tris-HCl pH 6,8	100 mM
SDS	4% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
B-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,2% (p/v)

- **Acrilamida 49%/Bis-acrilamida 0.5%**

Acrilamida	98 g
Bis-acrilamida	1 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL
Estocada na geladeira, ao abrigo de luz	

- **Tris-HCl 3 M, pH 8,3**

Tris	72,68 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

- **Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8**

Tris	12,11g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

- **SDS 10% (p/v)**

SDS	10 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

- **PSA 10% (p/v)**

Persulfato de amônio	100 mg/1 mL de água
----------------------	---------------------

- **Gel de empilhamento SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	10,41mL
Tris-HCl pH 8,3	3,75mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	1,50mL
PSA 10% (p/v)	140µL
TEMED	10µL

- **Gel de separação SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	5,90mL
Tris-HCl pH 8,3	13,35mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	13,25mL

Glicerol	7,48mL
PSA 10% (p/v)	140 μ L
TEMED	7 μ L

- **Solução corante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)
<i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250)	1% (p/v)

- **Solução descorante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

5.9. Soluções para ELISA, *Dot blot* e *Western blot*

- **PBS pH 7,4**

Na ₂ HPO ₄ 1 M	68,4 mL
NaH ₂ PO ₄ 1 M	31,6 mL
NaCl 2,5 M	58 mL
q.s.p. 1000 mL de H ₂ O destilada	

- **PBST pH 7,4**

PBS adicionado de tween 20 a 0,05% (v/v).

- **PBS-BSA 3%**

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 3% (p/v)

- **Corante Ponceau – solução estoque 10X**

Ponceau S	2 g
Ácido Tricloracético	30 g
Ácido sulfosalicílico	30 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

- **Tampão de transferência**

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
Metanol	20%
SDS	0,037%

- **Tampão da fosfatase alcalina (APB)**

Tris-HCl, pH 9,5	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	50 mM

- **Solução reveladora para *Western blotting* e *Dot Blot***

O **NBT** (nitroblue tetrazole) e o **BCIP** (5-bromo-4-cloro-indolil fosfato) – Amersham Pharmacia Biotech – foram preparados em soluções estoque a 50 mg/mL, sendo o NBT dissolvido em N,N- Dimetil formamida a 70%, enquanto o BCIP, em N,N- Dimetil formamida a 100%. Para o preparo de 10 mL da solução reveladora, foram adicionados, respectivamente, 66µL e 33µL dos estoques de NBT e BCIP em 10 mL de tampão APB.

- **Substrato para HRP: Solução ABTS** (Roche Molecular Biochemicals)

- **Substrato para ELISA cujo conjugado possui fosfatase alcalina**

p-Nitrophenyl Phosphate - Pnpp (Sigma Fast™ Pnpp, Soluble Alkaline Phosphatase Substrate).

5.10. Soluções para purificação de proteína em Coluna de Níquel Sepharose (HPLC)

- **Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)**

NaHPO ₂ -2H ₂ O	1.42 g
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	1.1 g
NaCl	23,38 g

Os solutos foram diluídos em 90 mL de água destilada, o pH da solução foi ajustado para 7,4, o volume foi completado para 100 ml e a solução foi filtrada com filtro de 0,45 μm . Concentrações finais: Fosfato = 160 mM e NaCl = 4M.

- **Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)**

Imidazol	13,63 g
----------	---------

Água destilada	90 mL
----------------	-------

O soluto foi completamente diluído, o pH foi ajustado para 7,4 com HCL, o volume final foi completado para 100 mL e a solução, filtrada em filtro com poros de 0,45 μm .

- **Tampão de ligação (240 mL)**

Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)	30 mL
--------------------------------------	-------

Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)	2,4 mL
-------------------------------------	--------

H ₂ O q.s.p.	240 mL
-------------------------	--------

Contrações finais: Fosfato = 20 mM, NaCl = 0,5 M, Imidazol = 20 mM.
pH 7,4.

- **Tampão de Eluição (80 mL)**

Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)	10 mL
--------------------------------------	-------

Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)	20 mL
-------------------------------------	-------

H ₂ O q.s.p.	80 mL
-------------------------	-------

Contrações finais: Fosfato = 20 mM, NaCl = 0,5 M, Imidazol = 500 mM.
pH 7,4

5.11. Soluções para preparação de DNA plasmidial

- **GET**

Glicose filtrada 20% (p/v)	0,92%
----------------------------	-------

EDTA 0,5M pH 8,0 (autoclavado)	10 mM
--------------------------------	-------

Tris-HCl 1M pH 7,4 (autoclavado)	26 mM
----------------------------------	-------

- **KOAc 3M**

Ácido acético glacial	60 mL
-----------------------	-------

KOAc 5M (filtrado)	11,5 mL
Água MilliQ (autoclavada)	28,5 mL

- **RNAse A - INVITROGEN**

RNAse A (10 mg/mL) diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e fervida em banho-maria por 20 minutos.

5.12. Enzimas e kits utilizados

- **SuperScript™ II Transcriptase Reversa - INVITROGEN**, utilizado para amplificar o cDNA.

- **Taq DNA Polimerase Platinum- INVITROGEN** (5 U/μL) fornecida com o seu tampão de reação 10X, utilizada nas reações de PCR.

- **T4 DNA Ligase - INVITROGEN** (1 unidade/μL), fornecida com o seu tampão 5X, utilizada nas reações de ligação.

- **Enzima de restrição Sfi I – NEW ENGLAND BIOLABS** (20 U/μL), acompanhada com tampão de reação NEB 2 10X.

- **dNTPs - Eppendorf** (100 mM/cada) utilizados nas reações de PCR.

- **Wizard SV gel and PCR Clean-up System – PROMEGA**, utilizado para eluir DNA a partir de gel de ágarose.

- **Cubetas de 0,2 cm – (Bio-Rad)** utilizadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad.

- **Glicogênio - Roche Molecular Biochemicals** (20 mg/mL).

- **Oligo (dT)12-18 Celulose - INVITROGEN** (0,5 μg/μL).

- **Centriprep 10 (Millipore, Amicon) – Utilizada** para concentrar amostras de scFv do sobrenadante de cultura.

- **DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace** – Amersham Pharmacia Biotech – Mix para a reação de seqüenciamento.

- **Eletrophoresis Matrix for MegaBace** - Amersham Pharmacia Biotech.

- **Multi Screen** – Placas de filtração de material biológico. Utilizadas em preparações de plasmídios nas placas para seqüenciamento automático (Millipore).

- **Placas de microtitulação com fundo chato** (Corning Costar)

- **Selo adesivo para placa de microtitulação** resistente a etanol (ICB Biomedicals)

- **Coluna HisTrap HP** - Amersham Biosciences – Coluna Níquel-Sepharose utilizada para purificar scFv por meio de cromatografia em HPLC.

- **Kit CK-NAC cinetico crystal** – (Bioclin). Utilizado para mensurar a atividade miotóxica.

- **Marcador de Massa Molecular Kaleidoscope Prestained Standards** (Bio-Rad).

Em gel contendo Tris-HCl, este marcador apresenta o seguinte padrão de bandas (cor/Daltons): -Azul = 198,355; rosa = 131,039; verde = 82,699; violeta=40,435; Laranja; 31,341; vermelho = 17,180; azul = 6,913.

- **Marcador de Massa Molecular 100bp** – Amersham Pharmacia Biotech

5.13. Oligonucleotídeos sintéticos específicos (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES)

Tabela 1 - Oligonucleotídeos sintéticos (BARBAS, 2000).

Oligo	Seqüência	Utilização
CSCVHo-F	5'GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'	Para amplificação dos genes de cadeia pesada de galinha a partir da extremidade 5'. Cria um peptídeo conector curto e é complementar ao CKJo
CSCG-B	5' CGT GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC 3'	Para amplificação dos genes de cadeia pesada de galinha a partir da extremidade 3'.
CSCVK	5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'	Para amplificação dos genes de cadeia leve de galinha a partir da extremidade 5'.
CKHJo-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'	Para amplificação dos genes de cadeia leve de galinha a partir da extremidade 3'. É complementar ao CSCVHo.
CSC-F	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'	Para amplificação dos scFv a partir do 5' da cadeia variável leve originada na primeira PCR com os iniciadores CSCVK e CKJo-B. Cria um sítio para <i>Sfi</i> I.
CSC-B	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG 3'	Para amplificação dos scFv a partir do 3' da cadeia variável pesada originada na primeira PCR com os iniciadores CSCVHo-F e CSCG-B. Cria um sítio para <i>Sfi</i> I, diferente daquele criado por CSC-F
MMB4	5' GCTTCCGGC TCG TAT GTTGTG T3'	Para seqüenciamento dos scFv clonados no vetor pComb3X a partir da extremidade 5' (cadeia leve).
MMB5	5' CGTTTG CCA TCT TTT CATAAT C 3'	Para seqüenciamento dos scFv clonados no vetor pComb3X a partir da extremidade 3' (cadeia pesada).

5.14. Anticorpos conjugados

- **Monoclonal Anti-HA** – conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA).
- **Monoclonal Anti-IgG de coelho** - conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA).
- **Monoclonal Anti-IgY** – conjugado com peroxidase (SIGMA).
- **Monoclonal Anti-M13** – Conjugado com peroxidase (Amersham Biotech).

5.15. Obtenção de Neuwiedase e peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*

Amostras da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e a metaloprotease Neuwiedase purificada são resultados do trabalho da Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues, que gentilmente cedeu este material biológico para a realização de nossos estudos.

5.16. Animais

- **Galinhas**

Galinhas da raça *White Leghorn* com duas semanas de idades foram doadas pelo Instituto Vallé, Minas Gerais, Brasil. Essas aves permaneceram em gaiolas adequadas localizadas em biotério com temperatura controlada, foram supridas com ração própria para a idade, assim como água foi fornecida *ad libitum*. Os animais permaneceram em bom estado nutricional.

• Camundongos

Os camundongos Swiss machos (20-25g) doados pelo Instituto Vallé, Minas Gerais, Brasil foram mantidos em condições padrões (temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 5\%$, ciclo de 12 horas luz/escuro) com dieta padronizada e água *ad libitum*.

5.17. Imunizações das galinhas

Foram utilizadas para a imunização quatro galinhas de três semanas de idade, da raça *White Leghorn*. Duas galinhas foram imunizadas com peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e outras duas utilizadas como controles negativo (imunizadas com adjuvante e PBS). Cada animal teve cinco mL de sangue coletado previamente ao início do esquema de imunização, e soros extraídos destas amostras serviram para determinar o título pré-imune como controles das imunizações.

O esquema de imunização foi o descrito por BARBAS *et al.* (2001), a primeira dose foi constituída por 200 µg de peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em PBS, que foi seguida por uma seqüência consecutiva de três doses (150 µg de peçonha bruta em PBS). Todas as inoculações foram por via intramuscular com intervalos de 14 dias. A primeira dose continha adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e as doses subseqüentes, adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co, USA) na proporção de 1:1 (v/v). Os animais tiveram seu sangue extraído uma semana após cada inoculação, e soros foram obtidos destas amostras para se determinar a produção de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA). Para o ELISA, placas de microtitulação Polisorp (NUNC) foram sensibilizadas com 10 µg de peçonha bruta, diluída em tampão bicarbonato, durante toda a noite a 4°C . Em seguida, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBST 0,1%, leite desnatado 5%), para posterior adição das amostras de soro das galinhas antes e após as imunizações e incubadas por 1 hora a 37°C . Após esse período, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBST 0,5% e adicionados anticorpos secundários (IgG de coelho anti IgY de galinhas conjugado com peroxidase (SIGMA) diluídos em tampão de bloqueio, o qual foi incubado durante 1 hora a 37°C . A placa foi novamente lavada com

PBST. A reação foi revelada pela adição de substrato enzimático contendo o-fenilenodiamino (OPD). Após a constatação da reação medida visualmente, entre as reações positivas e controles negativos, (cerca de 20 min após a colocação do substrato OPD), a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (*Flow Titertek Multiskan Plus - USA*).

Com a comprovação do título satisfatório, os animais foram sacrificados, seus baços coletados e imediatamente acondicionados em recipientes com nitrogênio líquido e posteriormente em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C até sua utilização.

5.18. Extração de RNA total

Os baços das galinhas imunizadas foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para tubos Falcon contendo Trizol (INVITROGEN). A extração de RNA foi realizada segundo instruções do protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração, o RNA foi analisado em gel de agarose 1%, aliquoteado e armazenado a -80 °C.

Todo o material utilizado para colheita e manipulação de amostras foi previamente tratado para eliminação de RNases.

5.19. Síntese de cDNA

Aproximadamente 20µg de uma mistura de RNAs dos baços das galinhas imunizadas, foram utilizados para a síntese de cDNA, utilizando o kit Acess Quick RT-PCR system (PROMEGA) e oligo(dT)₁₂₋₁₈ (INVITROGEN), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As condições para a reação no termociclador foram: 70°C por 10 min, 4°C por 1 min. Após este passo, a enzima transcriptase reversa – SuperscriptTM II (INVITROGEN) - foi adicionada aos tubos e um novo ciclo foi desenvolvido (1h a 42°C). O produto foi mantido a -20°C até sua utilização.

5.20. Amplificação dos fragmentos das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha

Para amplificar os fragmentos de DNA das cadeias leves e pesadas dos anticorpos, foram realizadas cinco reações com 10 μ L de cDNA (molde). Cada reação apresentou um volume final de 100 μ L, o qual continha 60 pmoles de oligonucleotídeos CSCVHo-F (senso) e CSCGB (reverso) para amplificação dos genes VH; CSCVK (senso) e CKJo-B (reverso) para amplificação dos genes VL, 10 μ L de tampão de PCR 10X (INVITROGEN), 8 μ L de dNTPs 2,5 mM (EPPENDORF) e 0,5 μ L de *Taq* DNA polimerase 5U/ μ L (INVITROGEN). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador nas condições seguintes:

94°C durante 5 minutos

37 ciclos de:

94°C durante 1 minuto

56°C durante 1 minuto

72°C durante 1,5 minuto

Extensão final: 72°C durante 11 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados utilizando-se o equipamento *ImageMaster VDS* (PHARMACIA BIOTECH).

As cinco reações de PCR (para amplificação da cadeia pesada e cadeia leve) foram reunidas, precipitadas com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5.2, e ressuspensos em água. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1% para purificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes VH e VL, utilizando-se o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega). As amostras de DNA eluídas e purificadas do gel foram quantificadas em gel de agarose, 1% utilizando-se um marcador de Massa Molecular 100bp (Amersham Pharmacia Biotech).

5.21. Amplificação dos fragmentos scFv de galinha (*Overlap*)

O *overlap*, definido como a sobreposição dos fragmentos VH e VL e posterior amplificação do fragmento unido (scFv), só é possível pelo fato de os iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos variáveis possuírem uma “cauda” complementar entre os fragmentos, formando um peptídeo conector (linker); o que permite a ligação entre os fragmentos. Um novo par de oligonucleotídeos externos foi utilizado para a amplificação do scFv. Foram realizadas 10 reações de PCR utilizando 500ng de VH e VL purificados, 60 pmoles de oligonucleotídeos CSC-F (senso) e CSC-B (reverso), 10 µL de tampão de PCR 10X, 8 µL de dNTPs 2,5 mM e 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase 5 U/µL.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador com as seguintes condições:

Desnaturação:

94°C durante cinco minutos

25 ciclos de:

94°C durante um minuto

56°C durante um minuto

72°C durante 1,5 segundos

Extensão final: 72°C durante 11 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e visualizados com auxílio do equipamento *ImageMaster VDS* (Pharmacia Biotech). As 10 reações foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e, em seguida, os fragmentos scFv foram purificados utilizando o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega)

5.22. Digestão dos fragmentos scFv e do vetor pComb3X com a enzima *Sfi* I

Para a digestão do scFv e do vetor, foram montadas duas reações utilizando 12 unidades de enzima *Sfi* I (20 U/µL – NEW ENGLAND BIOLABS) para cada 1 µg de DNA e tampão NEBuffer 2, em concentração final de 1X. As reações foram incubadas a 50°C durante 6 horas e, em seguida, analisadas em

gel de agarose. Os fragmentos digeridos foram purificados do gel utilizando o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega).

5.23. Ligação dos fragmentos de DNA scFv com o vetor pComb3X

Foram misturados 1400 ng (8,5 μ L) de pComb3X digerido com *Sfi* I, 700 ng (5,4 μ L) de scFv digeridos com *Sfi* I, 40 μ L de tampão da enzima 5X (INVITROGEN), 10 μ L de T4 DNA Ligase (INVITROGEN) e 136,1 μ L de H₂O q.s.p.

Três reações de ligação idênticas foram realizadas para aumentar a variabilidade da biblioteca. As reações foram incubadas a 24°C durante 20 horas e, em seguida, precipitadas com etanol/acetato de sódio, para posterior transformação das células competentes.

5.24. Preparação de células XL1-Blue eletrocompetentes

Adaptado de BARBAS *et al.*, 2000.

1 - Uma colônia de células XL1-Blue foi isolada e inoculada em 10 mL de meio SB contendo tetraciclina (30 μ g/mL), este pré-inóculo foi incubado a 37°C durante a noite, sob agitação de 250 rpm.

2 - Cinco mL do pré-inóculo foram diluídos em 500 mL de meio SB contendo glicose 2% e MgCl₂ 0,1 M e distribuídos em dois Erlenmeyers de 1000 mL. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm até D.O._{600nm} de 0,7.

3 - Após ter atingido a D.O._{600nm} desejada, os frascos foram resfriados no gelo durante 15 minutos. A partir deste passo, as células permaneceram no gelo, ou a 4 °C durante as centrifugações; além disso, frascos, ponteiras e glicerol utilizados nos passos seguintes foram resfriados antes do contato com as células.

4 - As culturas foram centrifugadas a 3000 x *g* durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos ressuspensos em 100 mL de glicerol 10% (v/v) gelado. A suspensão de células foi centrifugada a 3000 x *g* durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram submetidos a mais duas lavagens com 50 e 25 mL de glicerol 10% gelado.

5 - Após a terceira lavagem, as células foram ressuspensas no volume residual de glicerol, distribuídas em volume de 200 μ L e transferidas para microtubos novos e estéreis.

6 - As alíquotas foram congeladas em banho de álcool e gelo seco e estocadas a -80°C até serem utilizadas para eletroporação e como pré-inóculo nos procedimentos de seleção.

5.25. Transformação de células *E. coli* (XL1-Blue) por eletroporação

Adaptado de BARBAS *et al.*, 2000.

Para a transformação das células, 10 μ L do sistema de ligação foram misturados a 200 μ L de células competentes. Em seguida, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm previamente resfriada em gelo e submetida ao choque no eletroporador com os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω . O τ esperado nessas condições variar entre 4,0 e 5,0 milissegundos. Após a eletroporação, as células foram recuperadas, imediatamente, em 3 mL de meio SOC, transferidas para um tubo Falcon de 15 mL estéril e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm durante 1 hora. Diluições desta cultura foram semeadas em placa de petri com meio LB ágar contendo carbenicilina 100 μ g/mL para a determinação da eficiência de transformação. Colônias isoladas (clones) destas placas foram utilizadas na próxima etapa para análise de seqüências gênicas presentes na biblioteca.

Quatro sistemas de transformação foram realizados nesse passo.

5.26. Preparação de DNA plamidial em placa de Microtitulação

Adaptado a rede Genoma brasileiro

1- Clones isolados obtidos na etapa anterior foram inoculados em 1 mL de meio SB suplementado com 100 μ g de carbenicilina em placas *deep well*. A placa foi selada e, para melhorar a aeração, foram feitos 2 furos sobre cada poço, posteriormente, a placa foi incubada a 37°C durante 20 horas, sob agitação de 300 rpm.

2- Após a incubação, a placa foi centrifugada (4000 x g por 10 minutos), o sobrenadante descartado e aos sedimentos celulares foram adicionados 240µL de GET. A placa foi selada e os sedimentos ressuspensos por agitação (2 minutos).

3- Nova centrifugação foi realizada (4000 x g por 9 minutos, a temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e a placa ficou invertida sobre papel toalha por 5 minutos. Aos sedimentos foram acrescentados 80µL de GET e, sob agitação, as células foram ressuspensas.

4- Adicionaram-se 2,5µL de RNase A (10mg/mL) a cada poço de uma placa de microtitulação de fundo redondo, para o qual foi também transferido 60µL da suspensão de células. Todos os poços foram acrescidos com 80µL de NaOH 0,2N/SDS 1% (preparada na hora). A placa foi selada com adesivo novo, agitada por inversão (30X), incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada rapidamente.

5- Em seguida, foram adicionados 80µL de KOAc 3M a cada poço e novamente foi agitada por inversão seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e rápida centrifugação.

6- O adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90°C por 30 minutos e, posteriormente, o adesivo foi recolocado e a placa, resfriada em gelo por 10 minutos, seguido de centrifugação a 4000 x g por 9 minutos, 20°C.

7- Os sobrenadantes foram transferidos para uma placa-filtro Millipore fixada com adesivo no topo de uma microplaca de fundo "V" e, em seguida, centrifugados por 6 minutos a 4000 x g, 20°C.

8- O volume de 100µL de Isopropanol foi adicionado a cada poço com filtrado, este material foi homogeneizado por inversão (30X) e centrifugado (4000 x g, 20°C, 45 minutos).

9- Seguido ao descarte do sobrenadante, o DNA foi lavado com 200µL de Etanol 70% gelado e centrifugado (4000 x g, 5 minutos, 20°C). O sobrenadante foi removido e a placa invertida sobre papel absorvente foi rapidamente centrifugada até atingir 800 rpm.

10- Após a secagem da placa invertida à temperatura ambiente por 1 hora, o DNA foi ressuspense em 20 µL de água MilliQ, e deixado sob ligeira agitação a 4°C durante a noite toda. Posteriormente, o DNA foi estocado a -20°C.

5.27. Seqüenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones

Com o intuito de avaliar a diversidade da biblioteca, foram seqüenciados os DNA de clones isolados.

1- As reações de seqüenciamento foram preparadas com o *kit DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE) e utilizando-se um seqüenciador automático capilar MegaBace. As amostras foram preparadas para seqüenciamento em placas de 96 poços contendo aproximadamente 400 ng de DNA plasmidial e 2,5 pmoles do oligonucleotídeo MMB4 (senso) ou 2,5 pmoles do oligonucleotídeo MMB5 (reverso), em um volume final de 10 µL.

2- As condições da reação de seqüenciamento foram:

25 ciclos de:

95 °C por 20 segundos

50 °C por 15 segundos

60 °C por 1 minuto

3- As amostras foram precipitadas adicionando-se 2,5µL de Acetato de Amônio 7,5M e 55µL de Etanol 100% (v/v) seguido de homogeneização por inversão e centrifugação por 30 minutos a 2500 x *g* a 4°C.

4- Após o descarte do sobrenadante, 120µL de Etanol 70% (p/v) foram adicionados e a placa foi centrifugada a 2500 x *g* por 30 minutos e, então, o sobrenadante foi descartado.

5- O álcool residual foi removido por rápida centrifugação até 800 rpm com a placa invertida sobre papel absorvente. Depois de secadas, as amostras foram ressuspensas em 10µL de *loading buffer* por meio de agitação vigorosa em *vortex* durante 10 a 20 segundos.

6- De acordo com as instruções do fabricante, as amostras foram aplicadas no MegaBace.

5.28. Análise das seqüências

O seqüenciador (MegaBace 1000 da GE) gerou cromatogramas que foram processados e analisados nos programas Phred basecalling (ERWIN & GREEN 1998). A qualidade das seqüências foi verificada manualmente diante dos cromatogramas. As seqüências obtidas foram traduzidas com auxílio de alinhamentos realizados com o banco de dados do programa BlastX no NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Translations&PROGRAM=blastx&LAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on), e as regiões determinantes de complementariedade (CDRs) foram definidas manualmente e, em seguida, alinhadas pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

5.29. Preparação do fago auxiliar VCSM13

Adaptado de BARBAS *et al.* 2000.

- **Obtenção de placas de lise**

Para a obtenção das placas de lise, foram inoculados 2 µL de células XL1-Blue competente em 2 mL de meio SB contendo tetraciclina 10 µg/mL, incubado a 37°C, sob agitação até atingir O. D. a 600 nm de 0,6–1,0. Em seguida, foram feitas alíquotas de 50 µL de células em microtubos, adicionado 1 µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}), para garantir a formação de placas de lises isoladas, e incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente. Os 50 µL da cultura foram adicionados em 3 mL de meio LB top ágar liquefeito (45-50°C) e vertido em uma placa de petri contendo LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e, no dia seguinte, à incubação observou-se a formação de placas de lise.

- **Amplificação de placas de lise**

Para a amplificação das placas de lise, foram inoculados 10 µL de células XL1-Blue competente em 10 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, com tetraciclina 10 µg/mL, em um tubo Falcon de 50 mL e incubado a 37°C durante uma hora sob agitação. Uma placa de lise foi transferida com auxílio de um palito estéril ao tubo contendo a cultura de bactérias, para que ocorresse a infecção, em

seguida, o tubo foi incubado a 37°C sob agitação durante 2 horas. A cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 litro com 250 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, suplementado com tetraciclina 10 µg/mL, e incubada a 37°C sob agitação durante 1 hora. Após este período, foi adicionada kanamicina 70 µg/mL e houve incubação a 37°C, sob agitação durante a noite. No dia seguinte, a cultura foi transferida para tubos estéreis, centrifugada a 2500 x *g* durante 15 minutos e o sobrenadante coletado em tubos novos. O sobrenadante foi submetido à incubação a 70°C durante 20 minutos para eliminar as células residuais e, então, foi centrifugado a 2500 x *g*, durante 15 minutos. O sobrenadante foi estocado em tubos estéreis a 4°C.

- **Determinação do título da preparação de fagos auxiliares**

Para determinar o título da preparação dos fagos auxiliares, os mesmos foram inoculados em 2 mL de meio SB, contendo tetraciclina (10 µg/mL) e 2 µL de células XL1-blue competentes e incubado a 37°C em agitação até atingir a O. D. a 600 nm de 0,6 a 1,0. As células foram aliquotadas em 50 µL para microtubos e adicionado 1 µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram adicionados os 50 µL de células infectadas a 3 mL de meio LB top ágar, misturado e espalhado em placas contendo meio LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e, no dia seguinte, as placas de lise foram contadas e o título de fagos foi determinado em unidades formadoras de placas pfu/mL de fagos.

5.30. Obtenção de partículas virais a partir de células transformadas com Fagomídeos (biblioteca scFv)

Com o objetivo de obter partículas virais, células transformadas com o sistema de ligação (vetor pComb3X ligado com scFvs) foram submetidas a metodologia descrita abaixo.

À cultura de células transformadas (50 mL para cada sistema de transformação) e crescidas foram adicionados 10 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 25 µL de tetraciclina (10 mg/mL) e incubada a 250 rpm durante 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 15 µL de carbenicilina, incubando-se as células por mais uma hora, nas mesmas condições anteriores. A cultura foi então

transferida para um erlenmeyer de 1 L e foram adicionados 10 mL de fago auxiliar VCSM13 ($3,2 \times 10^{11}$ pfu/mL) e 150 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, contendo 75 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 75 µL de tetraciclina (20 mg/mL) e incubado em agitador durante 1,5 a 2 horas, a 300 rpm, a 37°C. Foram adicionados 280 µL de kanamicina (50 mg/mL) e mantidos nas condições descritas anteriormente durante a noite. No dia seguinte, a cultura foi submetida à centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi estocado a -20°C para futuras preparações plasmidiais. Ao sobrenadante foram adicionados 8g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 6g de cloreto de sódio e agitado a 250 rpm, durante 10 minutos, a 37°C para dissolver a fase sólida. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos. Os fagos foram coletados por centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa mantida invertida sobre papel toalha, por pelo menos 10 minutos. Para garantir a secagem do sedimento, as bordas da garrafa foram enxugadas com papel toalha. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v), a suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 12000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante, contendo as partículas virais, foi transferido para um tubo novo e estocado a 4°C.

Reamplificações da biblioteca não são indicadas, pois fagos que expressam diferentes anticorpos apresentam taxas de crescimento diferenciadas, portanto, ao reamplificá-la, podem ocorrer perdas em sua diversidade. Contudo, recomenda-se a reamplificação antes do procedimento de seleção, quando os fagos estiverem armazenados por mais de um dia, pois proteases presentes na solução degradam o anticorpo expresso.

5.31. Seleção da biblioteca de scFv contra peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*

O procedimento de seleção seguiu como descrito por BARBAS *et al.* (2001) (Figura 5).

1 – Dois poços de uma placa de microtitulação foram adsorvidos com 50 µg de peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* diluídos em 100 µL de tampão Bicarbonato de sódio (0,1M pH 8,6). A placa foi incubada a 4°C durante a noite e,

no dia seguinte, a solução contendo a antígeno foi descartada; aos dois poços foram adicionados 200 μ L de TBS-BSA 3% para bloquear, seguido de incubação a 37°C durante 1 hora.

2 - A solução bloqueadora foi descartada e 100 μ L da biblioteca de anticorpos em fagos, adicionados a cada poço. A placa foi selada e incubada durante 2 horas a 37°C, em estufa.

3 - A solução de fagos foi desprezada, e os poços lavados de acordo com o seguinte método: o volume de 200 μ L de TBST 0,5% foi pipetado vigorosamente por 5 vezes, a solução de lavagem permaneceu nos poços por 5 minutos antes de ser desprezada. O número de repetições deste passo variou de acordo com o ciclo de seleção (1° e 2° ciclos – 5 lavagens, 3° e 4° ciclos – 10 e 15 lavagens, respectivamente).

4 – Descartada a solução de lavagem, fagos ligados foram eluídos por incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, com 50 μ L de tampão de eluição ácido (Glicina-HCl 0,1M, pH 2,2), e vigorosas pipetagens (10X) foram realizadas nos poços com este mesmo tampão; de imediato, o eluato foi transferido a um novo tubo contendo 3 μ L do tampão de neutralização (Tris-base 2M).

5- O eluato de um poço (50 μ L) foi estocado a 4°C. O outro foi inoculado numa cultura de 2 mL de células XL1-Blue e incubado à temperatura ambiente durante 15 minutos. A cultura foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, no qual foram adicionados 6 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 1,6 μ L de Carbenicilina (100 mg/mL) e 6 μ L de tetraciclina (10 mg/mL) (neste ponto foram reservados 20 μ L da cultura para calcular o título de saída). O tubo foi incubado a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 250 rpm.

6- Após 1 hora, adicionaram-se ao tubo 2,5 μ L de Carbenicilina (100 mg/mL) e uma nova incubação foi realizada nas mesmas condições do passo anterior. Em seguida, o volume de 2 mL de fago auxiliar VCSM13 (10^{12} pfu/mL) foi acrescido ao tubo, e a cultura foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL, no qual estavam 91 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C suplementado com 46 μ L de carbenicilina (100 mg/mL) e 92 μ L de tetraciclina (10 mg/mL). O Erlenmeyer foi mantido durante 1,5 a 2 horas sob agitação de 300 rpm a 37°C. Seguidas 2 horas,

o volume de 140 μL de kanamicina (50 mg/mL) foi acrescentado ao meio e, então, a cultura foi incubada durante a noite nas condições descritas anteriormente.

7- No dia seguinte, a cultura foi submetida à centrifugação a $3.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . O sedimento foi estocado para futuras preparações plasmidiais a -20°C . Para precipitar fagos, foram adicionados ao sobrenadante 4 g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 3 g de cloreto de sódio, esta solução foi agitada a 250 rpm, durante 10 minutos, a 37°C , para dissolver a fase sólida. Posteriormente, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos.

8- A solução contendo os fagos foi submetida à centrifugação a $15000 \times g$, durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o tubo mantido invertido sobre papel toalha por, pelo menos, 10 minutos, para garantir a secagem do sedimento. Após esse tempo, as proximidades da boca do tubo foram enxugadas com papel toalha e o sedimento ressuspendido em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v).

9- A suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para um novo tubo e estocado a 4°C .

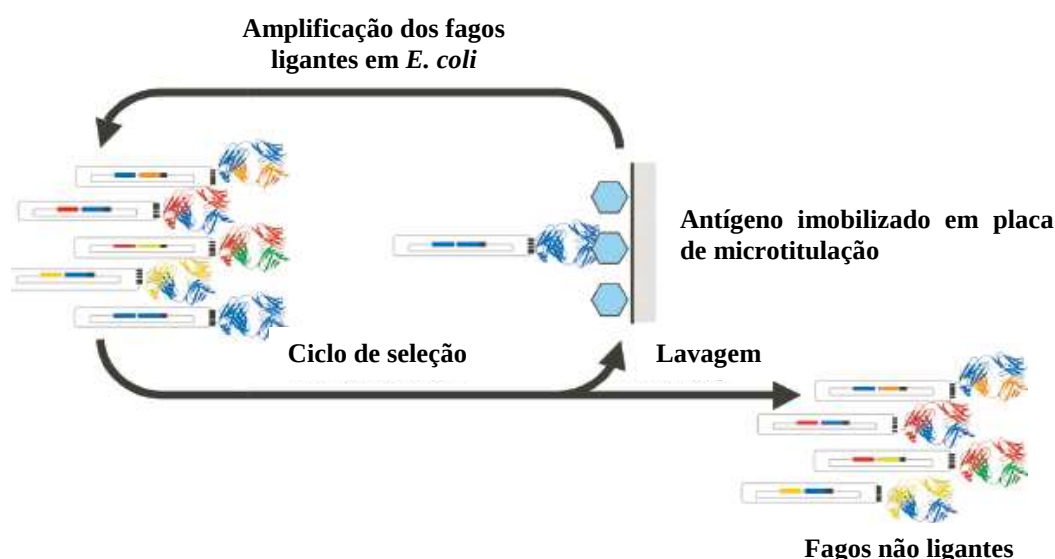


Figura 1. Seleção de fagos, expressando as diferentes formas scFvs. A triagem dos fagos foi realizada em quatro ciclos de seleção, utilizando placa de ELISA com os antígenos adóridos. A cada ciclo, os ligantes específicos foram selecionados e re-amplificados (SACHDEV & FELLOUSE, 2006)

Para titular o material amplificado e eluído, foram feitas diluições seriadas dos fagos para título de entrada (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) e diluições seriadas para títulos de saída (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). Estas diluições foram misturadas com as células (XL1-Blue) e incubadas à temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota de cada cultura foi semeada em placa de petri contendo meio LB ágar suplementado com Carbenicilina (100µg/mL) e Glicose 2%. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Os títulos foram determinados com base no número de colônias formadas multiplicado pelo fator de diluição. O resultado é expresso em unidades formadoras de colônias ufc/mL.

5.32. Extração de DNA plasmidial de bactérias (XL 1 blue) do terceiro ciclo de seleção

Bactérias (X-L 1 Blue) do 3º ciclo de seleção porta doras dos genes scFv selecionados foram previamente armazenadas. O DNA plasmidial foi extraído deste sedimento celular de acordo com a metodologia seguinte:

- 1 - O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de GET e agitado intensamente até se tornar homogêneo, em seguida, foi centrifugado (5000 rpm por cinco minutos a 4°C) e o sobrenadante, desprezado. Este passo foi repetido por duas vezes.

- 2 – Ao sedimento foram adicionados 200 µL de solução II (SDS 1%, NaOH 0,2M) recém-preparada, o conteúdo do tubo foi misturado por inversão e mantido no gelo por 20 minutos.

- 3 – O volume de 150 µL de solução III (tampão acetato) foi acrescentado ao tubo e cuidadosamente misturado por inversão (três vezes). Após 20 minutos de incubação no gelo, a amostra foi centrifugada (13000 rpm por 15 minutos a 4°C), o sobrenadante foi transferido a um novo tubo e o sedimento, desprezado.

- 4 – Após a adição na amostra de 500 µL de Isopropanol, houve mistura por inversão, o tubo foi centrifugado (15000 rpm por 10 minutos a 4°C).

- 5 – O sobrenante foi descartado e ao sedimento, foi acrescentado 600 µL

de Etanol 70%. O tubo foi centrifugado nas mesmas condições do passo anterior.

6 - O DNA presente no sedimento secou por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida, foi ressuspenso em 100 μ L de água MilliQ com 2 μ L de RNase.

A qualidade do DNA e sua concentração foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e espectrofotometria.

5.33. Transformação da linhagem de *E. coli* não supressora Top 10 com fagomídeos provenientes do terceiro ciclo de seleção

O método escolhido para transformar as células foi por choque térmico - CaCl_2 , o qual é de fácil manipulação e não requer equipamentos sofisticados. Este procedimento foi adaptado de MARANHÃO apud AZEVEDO *et al.* 2003.

1 – O pré-inóculo (500 μ L) de *E. coli* da cepa Top 10, crescida durante a noite, foi adicionado a 50mL de LB. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação até atingir uma O. D. a 600 nm de 0,2.

2 – Após o período de crescimento, as células foram centrifugadas a 3000 x g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de solução de CaCl_2 (50 mM gelada), com suave agitação. A partir deste passo, as células permaneceram em banho de gelo, ou a 4 °C durante as centrifugações.

3 – Nova centrifugação foi realizada nas condições descritas anteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso, lentamente, em 1mL de solução gelada de CaCl_2 a 50mM.

4 - As células foram consideradas competentes depois de incubadas por 1 hora no gelo.

5 – Em um tubo, foram adicionados 200 μ L de células Top 10 competentes e, também, 500 ng de fagomídeos do terceiro ciclo de seleção. Este sistema de transformação permaneceu em banho de água/gelo por 30 minutos, em seguida, foi incubado a 42°C durante 3 minutos.

6 – Após o choque térmico, foi acrescentado 1 mL de meio LB ao tubo, as células foram incubadas a 37°C por 1 hora.

7 – Amostra de células transformadas (100µL) foi semeada em placa contendo meio LB ágar, Carbenicilina (100µg/mL) e 2 % de Glicose. Este material foi mantido a 37°C durante a noite (16 horas).

8 – No dia seguinte, a eficiência da transformação foi determinada pelo número de unidades formadoras de colônias/mg de DNA contido em 1µL da cultura transformada.

Clones isolados obtidos nesta etapa foram utilizados na produção de scFv em solução.

5.34. Produção de scFv na forma solúvel (sem a proteína III do fago) em placa *deep well*

Fragmentos de anticorpos clonados no vetor pComb3X podem ser produzidos livres da proteína III, isto é possível quando células de *E. coli* não supressoras são transformadas com este vetor. A metodologia deste tópico relaciona-se com a expressão da forma solúvel dos scFvs por Bactérias Top 10, as quais foram previamente transformadas com fagomídeos do terceiro ciclo de seleção. Este procedimento foi adaptado de BARBAS *et al.* (2001).

1- Clones isolados obtidos na etapa anterior foram inoculados em 1mL de meio SB com 100µg de carbenicilina e 20mM de MgCl₂ em placa *deep well*. A placa foi selada e, sobre cada poço, foram feitos 3 furos para melhorar a aeração; em seguida, a placa foi incubada a 37°C, 300 rpm a noite toda.

2- No dia seguinte, 50µL da cultura de cada clone foram transferidas para uma placa de 96 poços, estéril, contendo 21µL de Glicerol 50%, o que resulta em uma solução com concentração final de Glicerol igual a 15%, ideal para estocar células a -80°C. O restante da cultura foi centrifugado a 3000 x *g* por 10 minutos, os sedimentos das células foram submetidos à extração de DNA plasmidial, o DNA foi seqüenciado e analisado.

3- Em outra placa tipo *deep well*, contendo 1 mL de meio SB suplementado com 50µg de Carbenicilina e 20mM de MgCl₂, foram inoculados 50µL da cultura e incubados a 37°C, sob agitação de 255 rpm, até atingirem uma O. D. a 600nm próxima de 1. Cerca de 2 a 3 horas.

4- Ao atingir OD indicada, a expressão do gene do anticorpo foi induzida com a adição de IPTG na concentração final de 1mM. A placa foi incubada durante a noite nas mesmas condições descritas acima.

5- Ao fim da indução, a placa foi centrifugada a 3000 x *g* por 20 minutos e o sobrenadante de cultura foi transferido para uma nova placa e armazenado a 4°C até ser utilizado nos ensaios de *Dot Blot* e ELISA.

5.35. *Dot blot* para análise da expressão heteróloga de moléculas scFvs

Este ensaio foi realizado para detectar clones que secretavam scFv no sobrenadante de cultura induzida por IPTG.

Do sobrenadante da cultura de cada clone individual, foram pipetados 5 µL em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) e deixado secar à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 3% em TBS e incubada a 4°C sob agitação, durante a noite. A membrana foi lavada, rapidamente, por 3 vezes com TBST 0,05%, imersa em uma solução contendo o anticorpo anti-HA conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) (diluído 1:5000 em BSA 3%) e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes, rapidamente, com TBST 0,05% e 1 vez com APB (tampão da fosfatase alcalina). O ensaio foi revelado com o substrato NBT/BCIP. Para parar a reação, a membrana foi lavada em água destilada.

Clones que expressaram scFv em solução foram testados quanto à reatividade (antigenicidade) contra a peçonha bruta de *B. pauloensis* e a metaloprotease denominada Neuwiedase, a qual foi isolada desta mesma peçonha (RODRIGUES *et al.* 2000). Os testes utilizados para avaliar a antigenicidade dos scFvs diluídos em meio de cultura foram o ELISA e *dot blot*.

5.36. Ensaio de ELISA com peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e da Neuwiedase (metaloprotease fibrinogenolítica da peçonha de *B. pauloensis*).

1- Numa placa de microtitulação (Nunc Polisorp), alguns poços (4 por clone scFv avaliado) foram sensibilizados com 100 µL de uma solução contendo peçonha bruta (10 µg/mL em 50 mM NaHCO₃, pH 9.6) e em outros poços foi

adicionada a solução de toxina Neuwiedase, nas mesmas condições descritas. Como controle negativo, utilizou-se BSA 3% em tampão bicarbonato. A placa foi incubada durante a noite a 4°C, sob leve agitação.

2- A solução de proteínas foi descartada e a placa lavada com PBST 0,05%.

3- O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 150µL de BSA 3% em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Na sequência, o bloqueio foi descartado, a placa foi invertida sob papel toalha, e 100µL do sobrenadante de cultura de indução dos scFv foram adicionados. Seguiu-se incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação. Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de um clone com pComb 3X vazio.

4- Os sobrenadantes foram descartados e a placa lavada 3 vezes com PBST 0,05%.

5- O anticorpo secundário anti-HA conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado (1:1000 em PBS) e a placa foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. O anticorpo foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBST.

6- Para revelar a reação, utilizaram-se 100 µL do substrato pNPP (SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate – Sigma) incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por, pelo menos, 30 minutos. Em seguida, a reação foi parada com 25µL de NaOH 3 M.

7- Enfim, a leitura da reação foi realizada no comprimento de onda 405nm, considerando-se os poços da placa que não foram sensibilizados (brancos).

5.37. Dot Blot

1- Tiras foram cortadas de uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Biosciences) (2 tiras para cada clone testado). A cada tira adicionaram-se 2µL de Neuwiedase, peçonha bruta de *B. pauloensis* diluídos em TBS. Para controles negativos, foram utilizados BSA 3%, e o sobrenadante de um clone com pComb 3X vazio.

2- Bloquearam-se as membranas com TBS-BSA3% por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com TBST 0,05%.

3- A cultura induzida (sobrenadante) de cada clone foi incubada com 2 tiras por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida, lavagens (3X) foram realizadas com TBST.

4- O anticorpo secundário anti-HÁ, conjugado com fosfatase alcalina, diluído em bloqueio (1:5000), foi adicionado e as membranas permaneceram à temperatura ambiente por 1 hora, sob leve agitação. Mais 3 lavagens com TBST e uma, com tampão APB foram feitas.

5- A revelação ocorreu com o substrato NBT/BCIP. Ao surgimento da marcação a membrana foi lavada em água destilada.

5.38. Produção de scFv em grande escala

O clone selecionado pelos testes de Elisa e *dot blot*, e que apresentou seqüências únicas de scFv após análises do DNA, foi utilizado para testes mais específicos. Para realizar os ensaios seguintes, o clone foi induzido novamente (como descrito no item 5.34), porém num volume maior de cultura (200mL). As quantidades de Carbenilicina, $MgCl_2$ e IPTG foram ajustadas de maneira proporcional ao aumento de volume (de 1 para 200mL).

5.39. Concentração do sobrenadante de cultura em coluna Centriprep

O volume de 200 ml de sobrenadante foi concentrado.

Adicionaram-se 15 mL de sobrenadante de cultura por coluna Centriprep, as quais foram centrifugadas com 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante que atravessou a coluna foi descartado e as colunas foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C. Em seguida, houve uma nova centrifugação por 5 minutos, e PBS foi adicionado até completar 15 mL. As centrifugações foram repetidas por mais duas vezes, com o intuito de trocar o meio de cultura por tampão fosfato.

5.40. Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC

A cromatografia de afinidade para purificar proteínas é fundamentada na capacidade de alguns aminoácidos doadores de elétrons tais como: histidina (His), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe) de se ligarem de maneira reversível a

íons metálicos (como o níquel) imobilizados em uma matriz. O *Kit HisTrap* (GE), utilizado neste passo, foi desenvolvido para uma rápida e reproduzível purificação de proteínas expressas com calda de histidina. O protocolo de purificação realizado seguiu as recomendações do fabricante.

1- Antes de injetar a amostra (obtida no passo anterior) na coluna de níquel, a mesma foi centrifugada a 40000 x *g* por 30 minutos, a 4°C e depois filtrada em filtro de 0,45µm.

2- A coluna His-Trap foi previamente lavada com 5mL de água destilada e deaerada. E, em seguida, foi equilibrada com 10 mL de tampão de ligação (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 20 mM, pH 7,4). Com a coluna equilibrada,.

3- A coluna foi conectada ao aparelho AKTA (Pharmacia) HPLC, equilibrada e então a amostra originária do sobrenadante de cultura foi injetada. Em seguida o aparelho iniciou automaticamente o sistema de purificação, com o seguinte parâmetro:

- Passagem de 10 mL de tampão de ligação para retirar as moléculas não ligadas à resina;
- Eluição com tampão Imidazol (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM, pH 7,4).
- Frações de 1 mL foram coletadas

4- Posteriormente, cada fração foi analisada por *dot blot*, e quantificada por leituras espectrofotométricas a 260 (A1) e 280 nm (A2). Em seguida, os valores obtidos foram calculados segundo a fórmula:

$$[] \text{ de proteína} = K3 \times A2 - K4 \times A1, \text{ onde: } K3 = 1552,0 \text{ e } K4 = 757,3$$

5- As frações que apresentaram maiores concentrações foram reunidas em um tubo, o volume foi completado para 15 mL com PBS, e o tampão de eluição com Imidazol foi substituído por PBS em coluna Centriprep. A amostra resultante foi congelada em nitrogênio líquido, e estocada a -20°C.

6- Imediatamente, antes do uso, a amostra liofilizada foi diluído em água MILLIQ autoclavada e dosada novamente.

5.41. Análise de proteínas em Gel SDS-PAGE

Adaptado de BARBAS *et al.* (2001)

Amostras purificadas de scFv ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

1- O gel de separação foi preparado em concentração de 16% (p/v) e polimerizado com TEMED e PSA, em seguida, foi adicionado o gel de empilhamento, o qual também foi polimerizado com auxílio de TEMED e PSA. O pente foi colocado sob o gel de empilhamento antes da polimerização deste.

2- O gel foi acoplado a uma cuba contendo os tampões apropriados para a corrida eletroforética.

3- Antes da aplicação, as amostras foram adicionadas de tampão de amostra (1/1) e submetidas à fervura em banho-maria por 4 minutos, seguido de resfriamento no gelo. O marcador de massa molecular foi aplicado no mesmo gel da amostra, este foi preparado de acordo com especificações do fabricante.

4- A eletroforese foi conduzida a 25mA até o azul de bromofenol atingir a base do gel.

5- O gel foi desmontado e submetido à coloração com prata de acordo com a metodologia descrita por SAMBROOK *et al.* (1989).

5.42. Ensaio de Western Blotting

Adaptado de SAMBROOK *et al.* (1989)

Para avaliar a especificidade do scFv (C5) contra toxinas da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*, e proteínas heterólogas produzidas por *E. coli*, foi realizado o teste de *Western blotting*.

1- Amostras com $15\mu\text{g}$ da peçonha bruta de *B. pauloensis* foram corridas em 2 géis SDS PAGE 16% e, em seguida, um dos géis foi corado com prata, e as proteínas do outro gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, $0,45\mu\text{m}$ – GE), utilizando-se para isso o sistema de transferência *Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio Rad). As condições para a transferência foram as seguintes: voltagem = 100V, amperagem = 250mA por 1,5 horas.

2- Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau durante 5 minutos e, em seguida, lavada com água Milli Q até a visualização das bandas. Posteriormente, a membrana foi cortada em 6 tiras (correspondentes às linhas de

corrida no gel), seus sítios inespecíficos foram bloqueados com TBS-BSA 3% por 1 hora, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Cada tira de membrana foi lavada por 3 vezes com tampão TBST 0,05%.

3- Incubaram-se 5 tiras em concentrações distintas de moléculas scFv diluídas em TBS-BSA 3%. Para controle negativo, uma tira foi incubada com anticorpo anti-IgY produzido em coelho (Sigma) na diluição de 1/1000. A incubação foi de 2 horas à temperatura ambiente.

4- As membranas foram lavadas 3 vezes em TBST 0,05% e incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente com anticorpo secundário (anti-HA conjugado com fosfatase alcalina- Sigma), diluído 1/5000 em TBS-BSA 3%.

5- Logo após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por mais 3 vezes, nas mesmas condições descritas acima, e uma lavagem foi realizada com a utilização do tampão fosfatase alcalina (APB). Por meio da solução reveladora contendo NBT/BCIP a reação foi revelada.

5.43. Atividades Biológicas

Para realizar as atividades biológicas (hemorrágica e miotóxica), foram utilizados camundongos Swiss machos (18-22g). Os controles positivos foram feitos com animais inoculados com peçonha bruta diluída em PBS. Controles negativos foram obtidos por meio da inoculação nos animais de tampão PBS (50ul). O grupo teste consistiu em incubar a peçonha bruta com anticorpos scFv por 30 minutos a 37°C, na razão de 1:10 (m/m peçonha/ anticorpo), ou seja, no ensaio foram usadas 10 vezes a quantidade de proteína do controle positivo.

5.43.1. Inibição da atividade hemorrágica

Amostras constituídas por 10µg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*, diluídas em 50 µL de PBS, foram inoculadas por via intradérmica no dorso de camundongos Swiss (n=6). Após três horas, os animais foram sacrificados e tiveram suas peles removidas. A atividade hemorrágica ficou comprovada com a presença do halo hemorrágico (NIKAI *et al.*, 1984). A quantificação desta atividade foi feita com a média das áreas (mm²) dos halos hemorrágicos formados.

5.43.2. Inibição da Atividade Miotóxica

Grupos de 04 camundongos Swiss foram injetados no músculo gastrocnemius direito com doses de 25 µg de peçonha bruta combinadas ou não com anticorpos scFv. Os animais controles negativos receberam injeção de PBS. Três horas depois, os camundongos foram sacrificados e sangrados por punção cardíaca, coletando-se o sangue em tubos contendo solução de citrato de sódio a 0,105M e, imediatamente centrifugados. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se amostras do plasma usando o Kit CK-UV cinético (Bioclin).

5.44. Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas (PLA₂ indireta e fibrinogenolítica) foram realizadas utilizando peçonha bruta ou a toxina Neuwiedase como controle positivo e PBS como controle negativo. Os grupos teste consistiram na incubação da peçonha ou toxina isolada com os anticorpos scFv, por 30 minutos a 37°C, nas razões de 1:2 e 1:10 (m/m peçonha ou toxina/ anticorpo).

5.44.1. Inibição da atividade fibrinogenolítica

Este teste foi realizado com o intuito de se demonstrar a capacidade neutralizante do anticorpo sintético sobre algumas toxinas presentes na peçonha, as quais apresentam atividade proteolítica sobre o fibrinogênio. Amostras contendo peçonha de *B. pauloensis* ou Neuwiedase (10µg em PBS ou 5µg de neuwiedase) foram incubadas, a 37°C por 30 minutos, com scFv (1/10, m/m, peçonha ou toxina/anticorpo), em seguida, às misturas scFv-VB ou scFv-Neuwiedase foi adicionada solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL) e, em seguida, feita novamente incubação a 37°C por 1 hora. Por fim, após o período de incubação, a essas amostras foram acrescentados 25 µL de tampão Tris-HCL 0,5M, pH 6,2 contendo 2% de SDS (m/v), 10% de β-mercaptoetanol (v/v), e 0,05% de azul de Bromofenol (m/v). As amostras foram analisadas em eletroferese (PAGE SDS). Método descrito por LAEMMLI (1970).

5.44.2. Inibição da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi mensurada por um ensaio hemolítico indireto em gel de agarose. Como substrato, foi utilizada uma mistura contendo eritrócitos de camundongo e emulsão de gema de ovo. Soluções com scFv (20 e 100µg) foram incubadas com peçonha bruta (10µg), a 37°C por 30 minutos. Soluções contendo apenas peçonha bruta foram utilizadas como controle. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem, onde 100% representam a ausência de atividade da peçonha.

6. Resultados

6.1 Imunizações de galinhas com a peçonha bruta de *B. pauloensis*

As aves imunizadas com a peçonha bruta de *B. pauloensis* produziram anticorpos reativos aos antígenos presentes na peçonha. Os títulos de anticorpos observados na primeira semana, após o início do esquema de imunização, foram baixos, contudo, posterior à segunda dose houve aumento abrupto na produção de anticorpos específicos à peçonha. Esta elevada taxa de imunoglobulinas permaneceu assim até a última dose de imunógeno inoculada (4^a dose). Os animais utilizados como controles negativos não desenvolveram anticorpos reativos à peçonha. Títulos obtidos após o esquema de imunização podem ser visualizados na Figura 2.

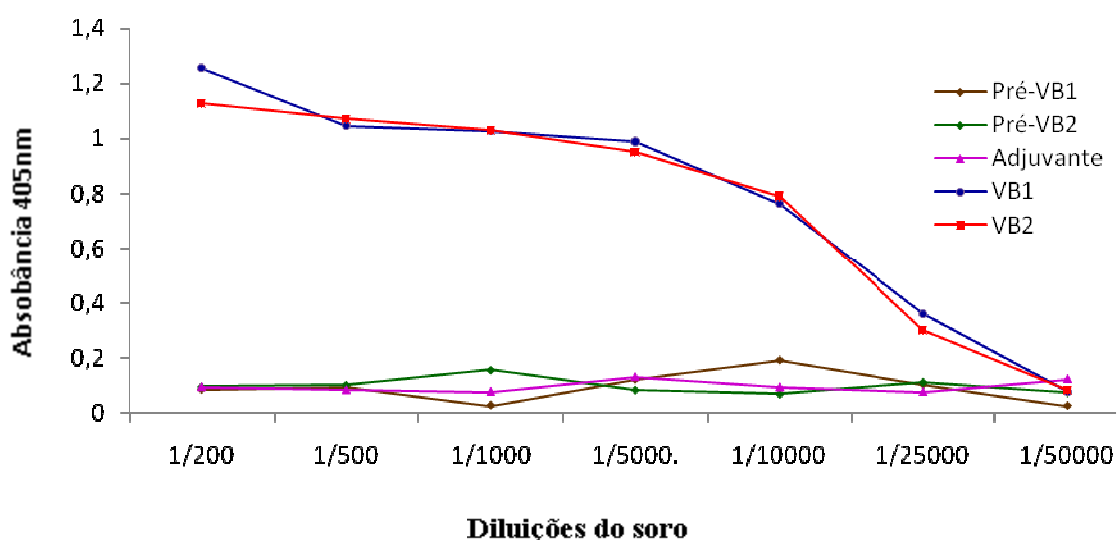


Figura 2 - Resposta de anticorpos em soros de galinhas para imunizações com a peçonha bruta de *B. pauloensis*. VB1 e VB2 representam os títulos de anticorpos obtidos por imunização de duas galinhas com a peçonha bruta de *B. pauloensis*; Pré-VB1 e Pré-VB2 correspondem aos soros pré-ímmes das galinhas VB1 e VB2, respectivamente; e Adjuvante refere-se ao soro da galinha imunizada apenas com tampão fosfato associado ao adjuvante de Freund.

Títulos acima de 1/1000 são suficientes para construção de biblioteca de anticorpos (BARBAS *et al.* 2001). Desta forma, após a obtenção dos títulos adequados, os animais foram sacrificados e seus baços coletados e utilizados para extração de RNA.

6.2 A amplificação dos genes que codificam as cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpos de galinha e amplificação do fragmento scFv (*Overlap*)

As sínteses dos genes VH e VL foram simplificadas pelo fato de um único par de iniciadores ser necessário para amplificar todo o repertório imune da galinha (ANDRIS-WIDHOPF *et al.* 2000). Para amplificar os genes da região variável da cadeia leve, foram utilizados os oligonucleotídeos CSCVK (senso) e CKJo-B (reverso). No caso da cadeia pesada, empregaram-se os oligos CSCVHo-F (senso) e CSCG-B (reverso). Os produtos destas amplificações foram visualizados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo. Os tamanhos observados dos genes para cadeias leve (cerca de 350 pb) e pesada (cerca de 400 pb) corresponderam aos divulgados na literatura (Figura 3 B). Em seguida, os produtos foram purificados e utilizados como molde para a reação de PCR de sobreposição na montagem do gene scFv (*overlap*). Nesta etapa, houve a sobreposição entre seqüências nucleotídicas complementares presentes nos oligonucleotídios CkJo-B (VL) e CSCVHo-F (VH), a seqüência sobreposta codifica um peptídeo que promove a união entre os fragmentos VH e VL (*Short Linker*). Outros iniciadores CSC-F (senso) e CSC-B (reverso), externos ao fragmento sobreposto, foram utilizados para amplificar o gene scFv de aproximadamente 750pb (Figura 3 D). O produto da reação de sobreposição foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e suas bandas foram purificadas do gel utilizando-se o *kit* de purificação para produtos de PCR.

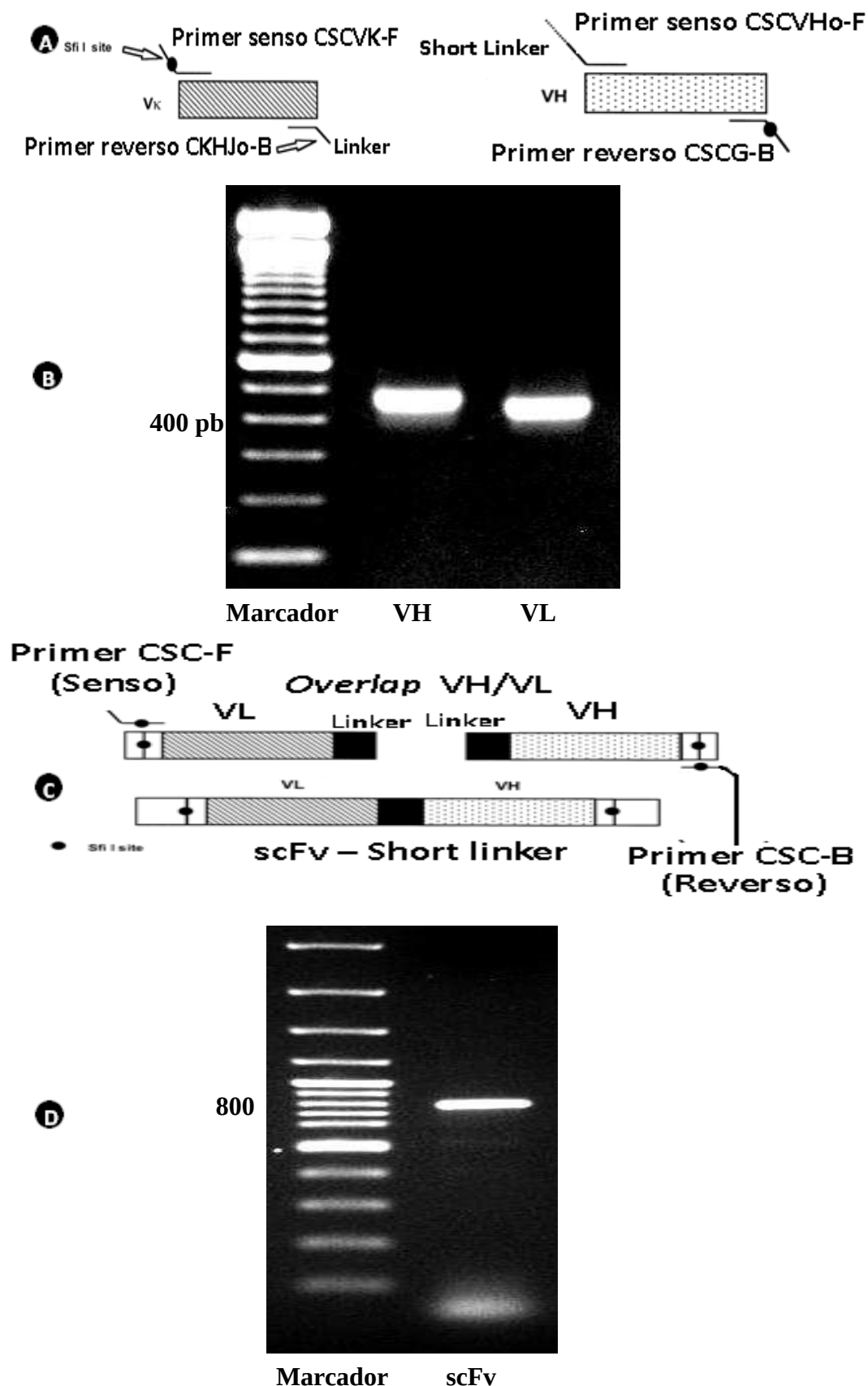


Figura 3 - Representação esquemática de reações em cadeia da polimerase para síntese dos genes scFvs. A: esquema da amplificação por PCR das cadeias variáveis leve e pesada. B: Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os produtos gênicos dos fragmentos: linhas: 1-marcador de massa molecular (100pb), 2-cadeia pesada, 3-cadeia leve. C: esquema da montagem do fragmento recombinante scFv por PCR. D: Gel de agarose 1%: Linhas: 1- Marcador de massa molecular (100pb); 2 – scFv montado com as cadeias VH e VL.

Para criar a biblioteca de fragmentos de anticorpos, os produtos gênicos scFv purificados foram clivados com a enzima de restrição *Sfi* I, agrupados e clonados no vetor pComb3XSS previamente digerido com a mesma enzima (Figura 4). Para estimar o tamanho da biblioteca, inicialmente, foi realizada uma reação de ligação em pequena escala. Os resultados obtidos neste teste indicaram que apenas duas reações de ligação definitivos seriam suficientes para produzir uma biblioteca com diversidade de 10^8 transformantes. Assim, foi produzida a biblioteca scFv de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *B. pauloensis* utilizando-se dois sistemas de ligação. A biblioteca apresenta variabilidade de 2×10^8 diferentes scFvs expressos em fagos.

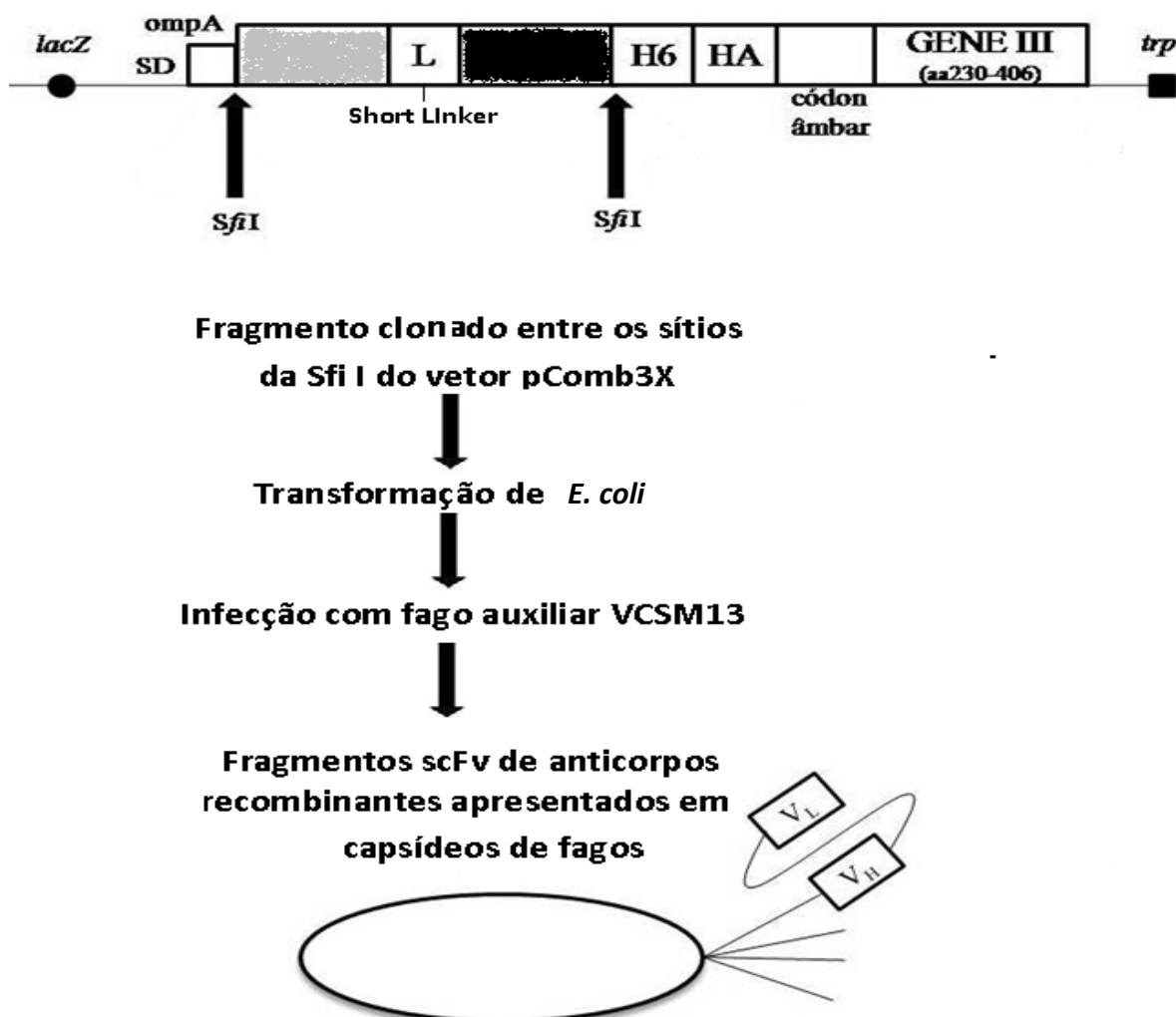


Figura 4 – Representação esquemática do vetor de expressão pComb3X após a clonagem do scFv. O vetor contém: uma região codificante para seis histidinas (H6) utilizada para purificar as proteínas recombinante em coluna de níquel, ou, para detecção por meio de anticorpos monoclonais anti-His Tag; uma região com o epítipo da hemaglutinina (HA) que permite a detecção do scFv com anticorpos anti-HA; o códon âmbar (TAG) que possibilita a expressão do scFv livre da proteína III, ou seja, livre do fago e na forma solúvel por algumas linhagens bacterianas não supressoras.

6.3. Análise da diversidade da biblioteca

As regiões VH e VL de clones presentes na biblioteca foram seqüenciadas e traduzidas para investigar a variabilidade. Foram obtidas 57 seqüências: 40 do gene Vk (VL) e 17 de VH, entretanto, quatro não apresentaram boa qualidade, desta forma não foi possível determinar todas as suas CDRs. A estrutura primária da região variável presente numa imunoglobulina da linhagem germinativa, indiferenciada, ou seja, sem sofrer os processos de rearranjo gênico, conversão gênica e mutação somática, foi comparada com as seqüências dos clones para verificar ganhos na variabilidade (Figura 5). Como resultado, observamos que todas as CDRs de todos os clones possuem seqüências diferentes das encontradas na linhagem germinativa. Em alguns casos, as diferenças consistem em alterações de apenas um ou dois aminoácidos (exemplos: CDR1 presente nas cadeias pesadas dos clones 5, 6, 22) e, ainda, numerosas CDRs possuem quantidades de aminoácidos variadas e distintas da linhagem germinativa (exemplos: CDR1 presente nas cadeias leves dos clones 1, 24 e 37). Os clones 11 e 26 possuem a mesma seqüência na CDR1 do gene da cadeia leve kappa (SGGGGSYG), mas apresentam as outras duas CDRs diferenciadas, portanto não representam a expansão de um clone. Do mesmo modo, as seqüências NNNNRPS e DNDKRPS ocorrem de forma repetida em CDR2s dos genes kappa presentes nos clones 3, 22, 36 e 20, 21, respectivamente. Todos os genes VH seqüenciados e avaliados apresentaram distintas composições de aminoácidos. Apesar de algumas seqüências repetidas nenhum clone avaliado foi idêntico a outro, assim, a biblioteca apresenta uma variabilidade adequada para seleção e análise de ligantes.

A

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Galinha VL	ALTQPSSVSANPGGTVKITC	SGDSS---YYG WYQQKAPGSAPVTVIY	DNTN-----	RPS NIPSRFSGSKSGSTATLTITGVRADDNAVYYC	AST DSSSTA-----	GI FGAGTTLTVL	
Clone 1	SGG---SSSSYYG		DDTN-----	RPS		GSEDSSITS-----	AGI
Clone 2	SG---ASSGYG		SNDQ-----	RPS			
Clone 3	SG---GSYSYG		NNNN-----	RPS		GAWDSSYWWVTDIG	
Clone 4	SGS---SDD---YG		DNSQQTLEHPRPS			GAWESSN-----	PAI
Clone 5	SGSS---D---YG		ANDK-----	RPS		GAWDSSSYG---IWGV	
Clone 6	SGS---SDS---YG		ENDK-----	RPS		GAWDSSEP-----	DGI
Clone 7	SGS---SGN---YG		ENTD-----	RPS		GTYDSSY-----	ADV
Clone 8	GSS---SSYYG		GNTN-----	RPS		GTEDSS-----	
Clone 9	SGS---DSS---YG		GNDK-----	RPS		GTYDSS-----	ADI
Clone 10	SGG---GGS---YA		ENNN-----	RPS		GSGDIT-----	T---TPI
Clone 11	SGG---GGS---YG		NSNN-----	RPS		GSGDTS-----	I---DAT
Clone 12	SGG---DGSYYYG		TNTN-----	RPS		GSADS-----	SGT
Clone 13	SG---GGY---YG		ANNK-----	RPS		GSYDSSG-----	N---SGI
Clone 14	SGG---TNKYG		YNDR-----	RPS		GSWDSSD-----	NSA
Clone 15	SGD---SSYYG		GNDK-----	RPS		GSEDSD-----	A
Clone 16	SGG---SSSYGYS		SNNQ-----	RPS		GSTDSDNM-----	DIG
Clone 17	SGG---S-GIYYG		YGNK-----	RPS		ASVDSTG-----	AGI
Clone 18	SGG---SAGNAYG		DNTK-----	RPS		GNQDNT-----	
Clone 19	SGS---R---YNAYG		SNNK-----	RPS		GSGDNSGA-----	AAV
Clone 20	SGD---SSWYG		DNDK-----	RPS		GSYDSSS-----	LGV
Clone 21	SGD---SS-YG		DNDK-----	RPS		GGRDSSSY-----	VGI
Clone 22	SGD---SSSSYG		NNNN-----	RPS		GNADSSG-----	VGI
Clone 23	SGG---SGSN---YG		YA NK-----	RPS		GSADSSS-----	I
Clone 24	SGGGGNSYYAYG		WNDQ-----	RPS		GSYEGST-----	S---VTGI
Clone 25	SGG---YYRYG		TSDK-----	RPS		GSYDN-----	T---ATTI
Clone 26	SGG---GGS---YG		SNDK-----	GPS		GNEDTSAG-----	YAG
Clone 27	SGG---SSNSDYG		YNNK-----	RPS		GSIEGSTDSG-----	YIGI
Clone 28	SG---SSSSSYG		DNNK-----	RPS		GSYGYTD-AG---GYFGV	
Clone 29	SGG---GSSSYG		GNTT-----	RPS		GSTDSTY-----	VGM
Clone 30	SGGGSSYGNYG		WNDK-----	RPS		ANSSTGTG-----	IF
Clone 31	SGGGD---SSYYG		GSSS-----	RLS		GSADSSYV-----	GI
Clone 32	SGG---CSYGYG		DSRK-----	RPS		GAWDSSSEV-----	GI
Clone 33	SGGS---YSYG		DNTQ-----	RPS		GASDSGSNV-----	GI
Clone 34	SGG---YSWL		DKQQQTLGH			GSADSGS-----	GI

	-----FR1-----	•••• CDR1 •••••	-----FR2-----	•••••CDR2•••••	-----FR3-----	•••••CDR3•••••	-----FR4-----
Galinha VL	ALTQPSSVSANPGGTVKITC	SGDSS-----	YYG WYQQKAPGSAPVTVIY	DNTN-----	RPS NIPSRFSGSKSGSTATLTITGVRADDNAVYYC	AST DSSSTA-----	GI FGAGTTLTVL
Clone 35	-----	SGTR-----	DAYG -----	SNDK-----	RPS -----	GNEDMSYGD-----	I -----
Clone 36	-----	SGGG-----	KNYG -----	NNNN-----	RPS -----	GTEDDSNT--D-----	SII -----
Clone 37	-----	SGDR-----	SGNYYG -----	ENNK-----	RPS -----	GGYDN-SAG-----	SA-----
Clone 38	-----	SGS-----	SSGYG -----	DDNK-----	RPS -----	DAWDSTTHA-----	AI-----
Clone 39	-----	SGGG-----	SNGYG -----	YNDK-----	RPS -----	GSWDSSSGA-----	SI-----
Clone 40	-----	SGGQWYA-GSYYYG	-----	TNNK-----	RPS -----	GTYDSTYVD-----	I-----

B

	-----FR1-----	• CDR1 •	-----FR2-----	•••••CDR2•••••	-----FR3-----	•••••CDR3•••••	-----FR4-----
Galinha VH	SGGGLQTPGGALRLVCKASGFTFS	SYDML	WVRQAPGKGLEFVA	GIDNTGS-----	YTHYGA AVKG	RATISRDNGQSTGRQLNLR AEDTATYYCAK	RTAGSIDA WGHGTEVIVSS
Clone 5	-----	SYAMY	-----	GIYTG-GSGTG YG-----	SAVKG	-----	AA--VTCGGYT CAGDIIDA
Clone 12	-----	SNGMA	-----	DINAA-G-SNTYYG-----	SAVQG	-----	GM--LDL-----
Clone 9	-----	SHAMH	-----	GIGS-GSGSYTYA-----	PAVKG	-----	TTY-----
Clone 1	-----	SHGMN	-----	GISSGSGSGTAYG-----	SAVKG	-----	SAY--GGSCASCHGDDIDA
Clone 37	-----	SYEMQ	-----	VIRS--DGSYTWYG-----	PAVDG	-----	AAG-GYCGWWSGYVGGIDA
Clone 6	-----	SYDMQ	-----	GINA--AGSFTHYG-----	AAVKG	-----	ALGSDYCDRTFC SAGIVDA
Clone 17	-----	DYAMG	-----	GIGK--TGSDTWYG-----	TAVKEG	-----	TS-----
Clone 36	-----	--AV--	-----	GVGRWYWQHRRHLRAGGEG	-----	-----	PFG--YCAGGCY IAGSIDA
Clone 18	-----	DRGMH	-----	GISK--TGSYTG YG-----	SEG	-----	DAD--NKGWYGGDNIDA
Clone 27	-----	SHAMN	-----	RLLAAGWCHILRVDER-AVPPS	-----	-----	DVH-GYSTSGTWSINSIDA
Clone 2	-----	YGMN	-----	GYLAG-----	QWMA--RQDTG	-----	-----
Clone 23	-----	YCMQW	-----	AISSSGR--YTY YGT-----	AVKG	-----	KWVMFLFI-----
Clone 3	-----	SYGMN	-----	CIDPNSGTWHGYGA--	AVNG	-----	VFY-----
Clone 22	-----	SYAG Y	-----	GIYTGGRQWHRIRV	-----	-----	AAVTCG-WLY-----
Clone 4	-----	SYGMG	-----	GIGNTGRYTD TYA-----	PAVKA	-----	PFG--YCAGGCY IAGSIDA
Clone 40	-----	SYNMQ	-----	GIRNDGS--DTY A-----	PAVKG	-----	-----
Clone 26	-----	DRGMY	-----	AISNDGS--FTLYA-----	PAVKG	-----	-----

Figura 5 - Comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas de clones VL (A) e VH (B) e a seqüência correspondente a linhagem germinativa de galinha. Os alinhamentos entre os clones foram realizados apenas entre as CDRs, os arcabosos (FRs) foram considerados idênticos aos observado na linhagem germinativa.

6.4. Seleção de fagos presentes na biblioteca combinatorial de anticorpos contra antígenos da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*

Partículas de fagos expressando moléculas scFvs ligantes a peçonha bruta de *B. pauloensis* foram isoladas da biblioteca. Este processo ocorreu por quatro ciclos de seleção, os quais consistem em ligações dos scFvs a peçonha, lavagens dos anticorpos não ligados, eluição e amplificação de fagos específicos. Para obter anticorpos monoclonais com alta afinidade, houve aumento na pressão de seleção mediante aumentos progressivos na quantidade de lavagens do 2º para o 4º ciclo de seleção. Devido à elevação na estridência, ocorreu enriquecimento na quantidade de clones eluídos do 1º ao 4º ciclo de seleção (Tabela 2).

Tabela 2 - Títulos obtidos em quatro ciclos de seleção de uma bibliotecas de fagos-scFv contra peçonha bruta de *B. pauloensis*. Títulos de entrada e saída, as condições de estridência nas lavagens são mostradas para cada ciclo.

Ciclo de seleção	Entrada ufc/mL	Saída ufc/mL	Número de lavagens com PBST 0,05%
1º	$8,32 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^4$	5
2º	$7,8 \times 10^{11}$	8×10^4	5
3º	5×10^{11}	$9,7 \times 10^5$	10
4º	$8,99 \times 10^{11}$	$1,43 \times 10^6$	15

6.5. Transformação da linhagem de *Escherichia coli* não supressora (TOP10) com fagomídeos provenientes dos terceiro e quarto ciclos de seleção e expressão de moléculas scFv em solução

Fagos presentes no eluato dos 3º e 4º ciclos de seleção foram amplificados em XL1-Blue, em seguida, os plasmídeos destas bactérias foram extraídos e utilizados para transformar bactérias TOP 10. A linhagem não supressora foi requerida para expressar moléculas scFv, livres da proteína III viral, em solução.

Depois de induzidos com IPTG, clones isolados de bactérias TOP 10 transformadas foram avaliados quanto à expressão dos scFvs no meio de cultura. A presença das imunoglobulinas heterólogas nos sobrenadantes induzidos foi detectada por ensaios de *Dot-Blot*, com anticorpo anti-HA. Foram avaliados 90 clones para cada ciclo de seleção, e os resultados mostraram a ausência de expressão por parte dos clones obtidos no 4º ciclo; entretanto, quatro clones secretores de scFv foram identificados nos sobrenadantes induzidos de bactérias transformadas com o 3º ciclo de seleção. Para controles negativos, foram utilizados o fago VCSM13 e o sobrenadante do vetor PComb3X vazio transformado em TOP 10 e induzido nas mesmas condições. A membrana revelada pode ser visualizada na Figura 6. Os clones localizados nas posições C5, F1, F5 e F8 apresentaram marcações positivas. O clone C5 apresentou maior intensidade de marcação que os demais, indicando maior nível de expressão em relação aos outros clones.

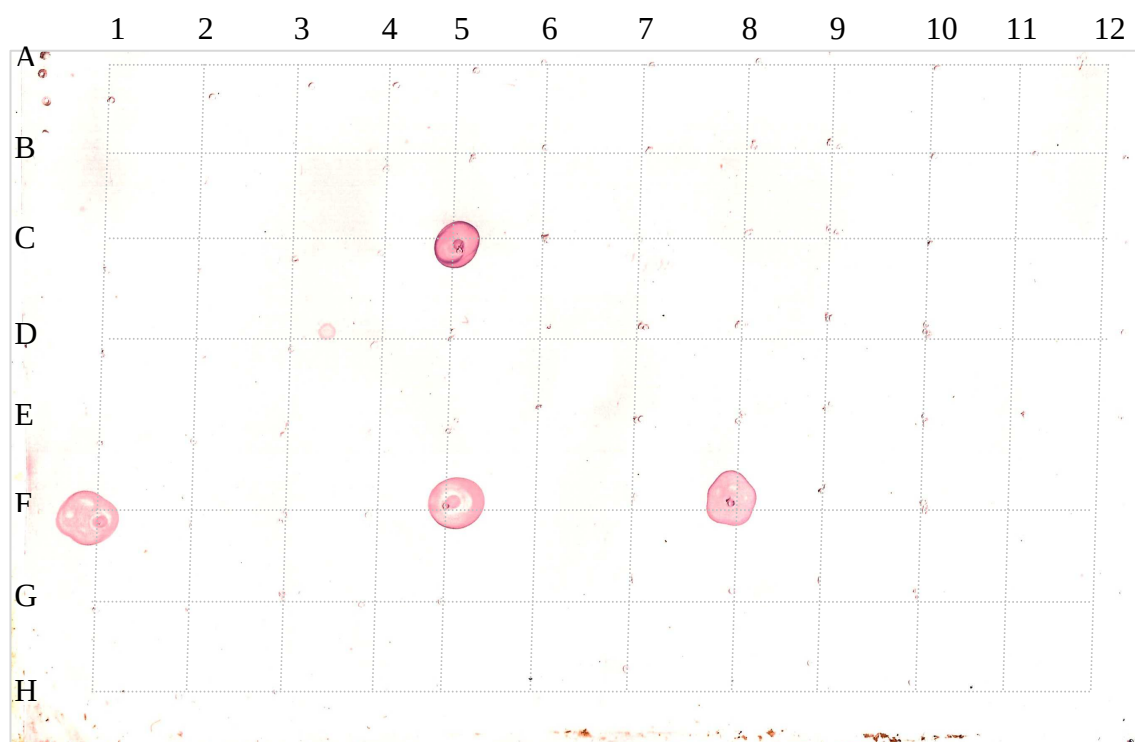


Figura 6 - Dot Blot de clones induzidos por IPTG (terceiro ciclo de seleção). Os controles negativos: sobrenadante de pComb vazio e Fago VCSM13, estão localizados nas seguintes posições: C12, D12 e E12; F12, G12 e H12, respectivamente. As demais posições são ocupadas por sobrenadantes de clones constituídos por bactérias TOP 10 com fagomídeos do terceiro ciclo de seleção. Os clones positivos correspondem aos pontos marcados na membrana.

Os clones produtores de scFv em solução tiveram suas seqüências de aminoácidos analisadas e mostraram distintos VHs e VLs entre si e entre os encontrados na biblioteca nativa (antes da seleção) (Tabela 3). Contudo, a CDR2 da cadeia leve presente no clone C5 ocorre também no clone 35 da biblioteca nativa. Posteriormente, os quatro clones foram avaliados quanto às suas antigenicidades.

Tabela 3- Sequencia de aminoácidos dos clones produtores de scFv solúvel

Clones	Fragmento variável de cadeia leve			Fragmento variável de cadeia pesada		
	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
C5	SSSGYGYS	SNDKRPS	GSGDSTYVGI	DYGMG	SIQNDGSYPNYGS	TSMIYSLSSDRIDA
F1	SGVSYSYG	SNDQRGS	GSFRDTGYVGI	SHASD	GSATRGTIVYGSG	GEVDIGTGYSSIDA
F5	SGVWQHL	MTTTRPS	WEQDSSYVGI	TRGMF	GIDDDGSFPNYGSAVKG	GSLLWSLSRLHRRM
F8	SGGAYYYG	SDATRNPS	GSSAASSDGI	DRGMF	WYWFPKLRVGGEG	GKVPCCGHYPGYIDA

Para avaliar a capacidade de ligação específica das moléculas scFv-solúveis, produzidas pelos quatro clones induzidos (C5, F1, F5 e F8), foram realizados testes de ELISA e *Dot Blot* com duas peçonhas brutas e a Neuwiedase. Os estudos das interações foram determinados inicialmente por ELISA, no qual os controles negativos foram obtidos com o sobrenadante induzido de um clone contendo PComb3X vazio, e poços sensibilizados com soroalbumina sérica bovina. As amostras testadas foram incubadas com peçonha bruta de *B. pauloensis*, Neuwiedase e BSA. Os resultados demonstram a imunorreatividade do anticorpo presente no sobrenadante do clone C5 aos dois antígenos (Figura 7). Os demais anticorpos não apresentaram respostas significativas. Em seguida, a imunorreatividade do sobrenadante do clone C5 foi testada para antígenos presentes na peçonha bruta de *B. alternatus*, por meio do

ensaio de *Dot blot*. Como controle positivo, foi utilizado anticorpo anti-HA blotado diretamente na membrana e peçonha bruta de *B. pauloensis*, já os negativos foram feitos com sobrenadante induzido de um clone contendo pComb3X vazio, e BSA 3% blotado diretamente na membrana de nitrocelulose. Nesta avaliação, foi comprovada a reatividade da molécula scFv contra antígenos presentes na peçonha bruta de *B. alternatus* (Figura 8). Isto mostra uma reatividade cruzada do anticorpo com prováveis toxinas presentes em peçonhas de espécies distintas. Os controles negativos não marcaram as membranas.

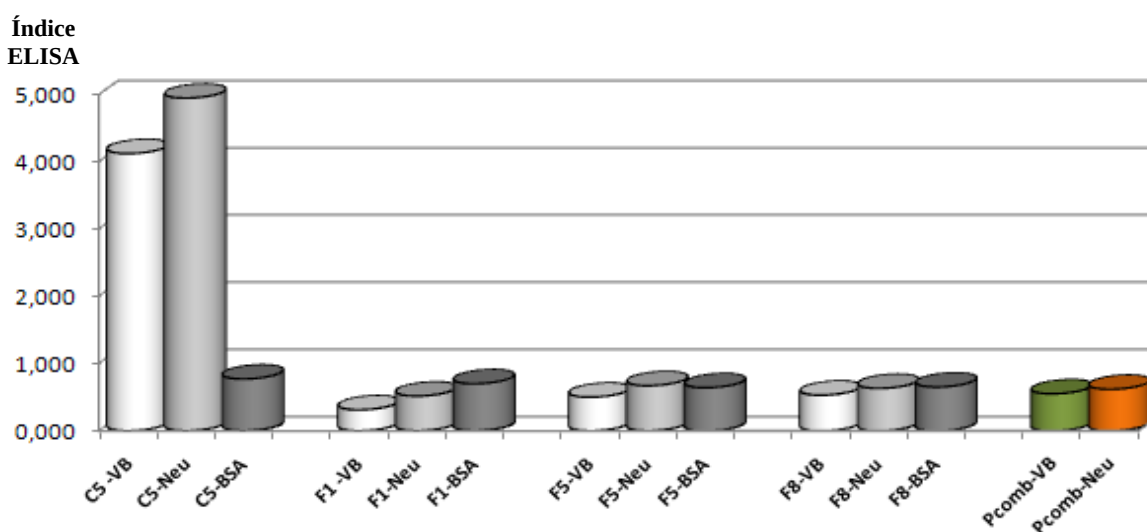


Figura 7- Análise por ELISA direto mostrando a imunorreatividade de anticorpos expressos em solução contra a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e Neuwiedase. Para controles negativos, foram utilizados sobrenadante do vetor PComb3X vazio (PComb-VB, PComb-Neu), e poços de ELISA sensibilizados com BSA 3%. O sobrenadante induzido de cada clone (C5, F1, F5 e F8) foi incubado com peçonha bruta (VB), Neuwiedase (Neu) e BSA. O sobrenadante do clone C5 apresentou uma resposta positiva para a peçonha bruta e para a Neuwiedase, os outros sobrenadantes não indicaram reatividade neste teste.

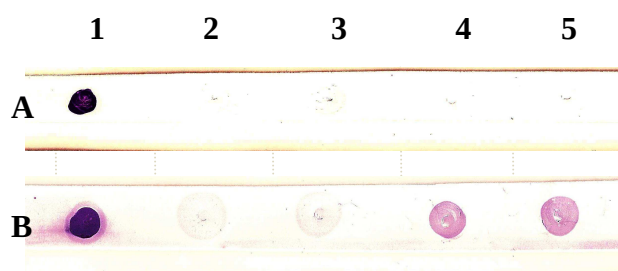


Figura 8- Imunogenicidade de moléculas scFvs em sobrenadante induzido do clone C5 contra a peçonha bruta de *Bothrops alternatus*. Controles positivos foram obtidos com anticorpo anti-HA (posição 1 nas membranas A e B), e os controles negativos foram feitos com uma solução de BSA 3% (posições 2 e 3 das membranas A e B). As peçonhas brutas de *B. alternatus* e *B. pauloensis* estão localizados nas posições respectivas 4 e 5 das membranas A e B. A membrana A representou um controle negativo, foi incubada com sobrenadante induzido de clone, contendo pComb3X vazio. As marcações na membrana B indicam a antigenicidade do anticorpo frente a duas peçonhas brutas utilizados.

6.6. Produção e purificação de scFv em larga escala

O clone selecionado pelos testes anteriores foi induzido em 200 mL de meio SB; o sobrenadante foi concentrado em coluna centripep 10 e, posteriormente, purificado, utilizando-se coluna de níquel em sistema HPLC.

Depois de aplicado o material, a coluna de níquel foi lavada com 10 mL de tampão fosfato e as moléculas ligadas foram eluídas com tampão imidazol. Ao final da cromatografia, frações purificadas foram obtidas em 10 tubos contendo 1 mL cada. Os tubos 2, 3, e 4 apresentaram maiores concentrações de proteínas e maiores reatividades com anticorpos anti-HA (Figura 9 A); contudo, após a quinta fração, as concentrações protéicas e reatividade com anticorpo anti-HA foram diminuindo ao longo da eluição, sendo que, a partir da sexta alíquota, havia apenas traços de proteínas. O conteúdo dos tubos com maiores concentrações protéicas foi agrupado e o tampão imidazol foi substituído por tampão fosfato em coluna Centripep. Após este passo, o volume de 10 µL da amostra foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, para se verificar a eficácia da purificação; o gel foi corado com prata e revelou a presença apenas de uma banda com massa molecular próxima de 30 kDa (Figura 9 B), correspondendo ao tamanho de moléculas scFvs. Depois de purificados, os anticorpos monoclonais foram liofilizados e armazenados a -20°C.

A quantificação dos scFvs foi feita por dosagem de proteínas e o rendimento observado foi de 0,66 g/L de clone C5 cultivado.

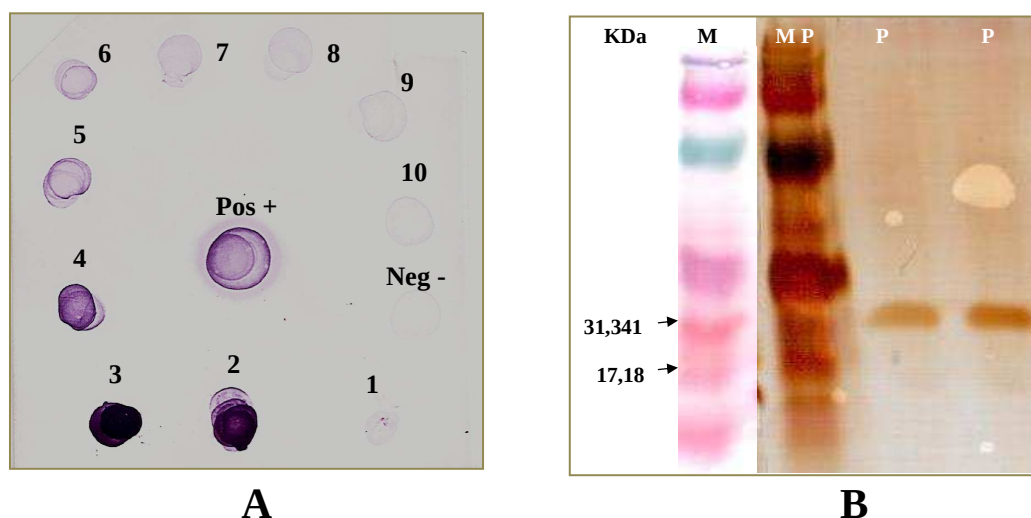


Figura 9 - Dot Blot e eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, para análise da purificação de moléculas scFvs. A: membrana de nitrocelulose, contendo 10 frações obtidas na purificação de moléculas scFvs, os números indicam a localização de cada fração. Controles positivo (Pos +) e negativo (Neg -) foram feitos com meio de cultura induzido do clone C5 e BSA 3%, respectivamente. A detecção de fragmentos de anticorpos foi feita com auxílio do anticorpo anti-HA. As frações 2, 3 e 4 apresentaram maiores intensidades de marcação, indicando maiores concentrações de scFvs. B: Eletroforese em gel de poliacrilamida 16% das amostras purificadas. M: marcador de massa molecular (Kaleidoscope -BioRad) não corado com prata; MP: marcador corado com prata; P: amostra purificada. Cada linha referente à amostra purificada apresenta apenas uma banda com massa molecular próxima de 30 kDa, correspondendo ao tamanho indicado das moléculas scFv.

6.7. Avaliação do perfil de antígenos presentes na peçonha de *B. pauloensis* reconhecidos pelo scFv (C5)

Uma estimativa dos antígenos presentes na peçonha bruta de *B. pauloensis*, reconhecidos pelo anticorpo recombinante, foi feita por análise de *Western Blot*. A peçonha bruta foi resolvida por eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, e as bandas coradas com corante *Ponceau*. A membrana foi incubada com o anticorpo recombinante e depois com anti-HA conjugado com fosfatase alcalina. O resultado pode ser visto na Figura 10. Nas membranas, visualiza-se a presença de pelos menos quatro bandas distintas, das quais, duas apresentam massas moleculares entre 40 e 80 kDa (seta A), são as bandas mais intensamente marcadas e essa intensidade aumenta com elevações nas concentrações de scFv (tiras de 1 a 5). Outras duas bandas estão apontadas pelas setas B e C, a primeira indica massas moleculares variando entre 17 e 30

KDa e as últimas apontam bandas pouco menores que 17 kDa. A membrana 1, incubada com maior diluição de scFv (1/3000), mostrou imunorreatividade apenas com as duas bandas que possuem maiores massas moleculares, indicando maior afinidade a estas.

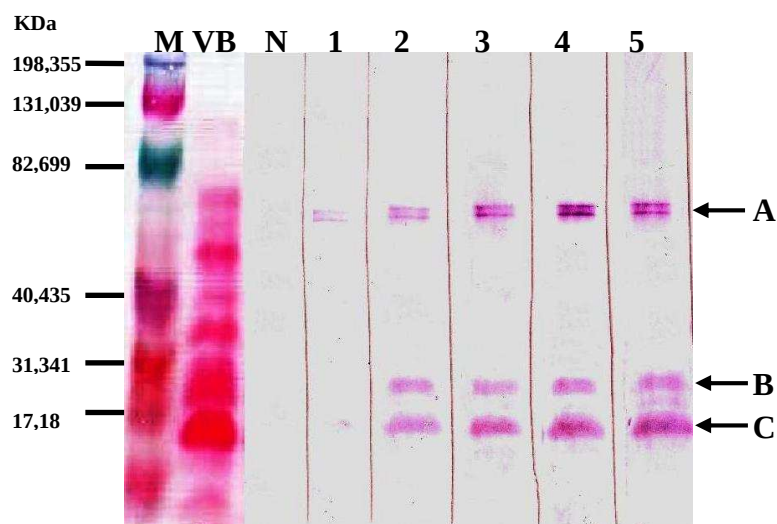


Figura 10- Perfil antigênico da peçonha bruta de *B. pauloensis* reconhecido pelo anticorpo scFv (C5). Para controle negativo da reação o scFv foi substituído por anticorpo anti-IgY (linha N). As linhas M e VB mostram uma membrana contendo marcador molecular (Kaleidoscope -BioRad) e peçonha bruta, respectivamente, corados com Ponceau. As linhas 1, 2, 3, 4 e 5 representam membranas transferidas com bandas da peçonha bruta, e posteriormente incubadas com crescentes concentrações de scFv (1/3000, 1/2000, 1/1500, 1/1000 e 1/800). As setas apontam as bandas reativas ao anticorpo.

Como observado, o espectro de reconhecimento antigênico do anticorpo sobre a peçonha bruta de *B. pauloensis* variou entre proteínas de baixas a elevadas massas moleculares, comprovando, desta forma, a reatividade cruzada deste anticorpo. Frente à antigenicidade demonstrada pelo scFv contra diferentes componentes da peçonha, surgiu a possibilidade desta molécula apresentar capacidade neutralizante de algumas atividades tóxicas induzidas pela peçonha.

6.8. Inibição das atividades biológicas:

6.8.1. Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta

Para avaliar a neutralização da hemorragia causada pela peçonha de *B. pauloensis*, duas doses mínimas hemorrágicas foram previamente incubadas com os anticorpos monoclonais, e posteriormente injetadas intradermicamente em camundongos. Os resultados podem ser vistos na Figura 11.

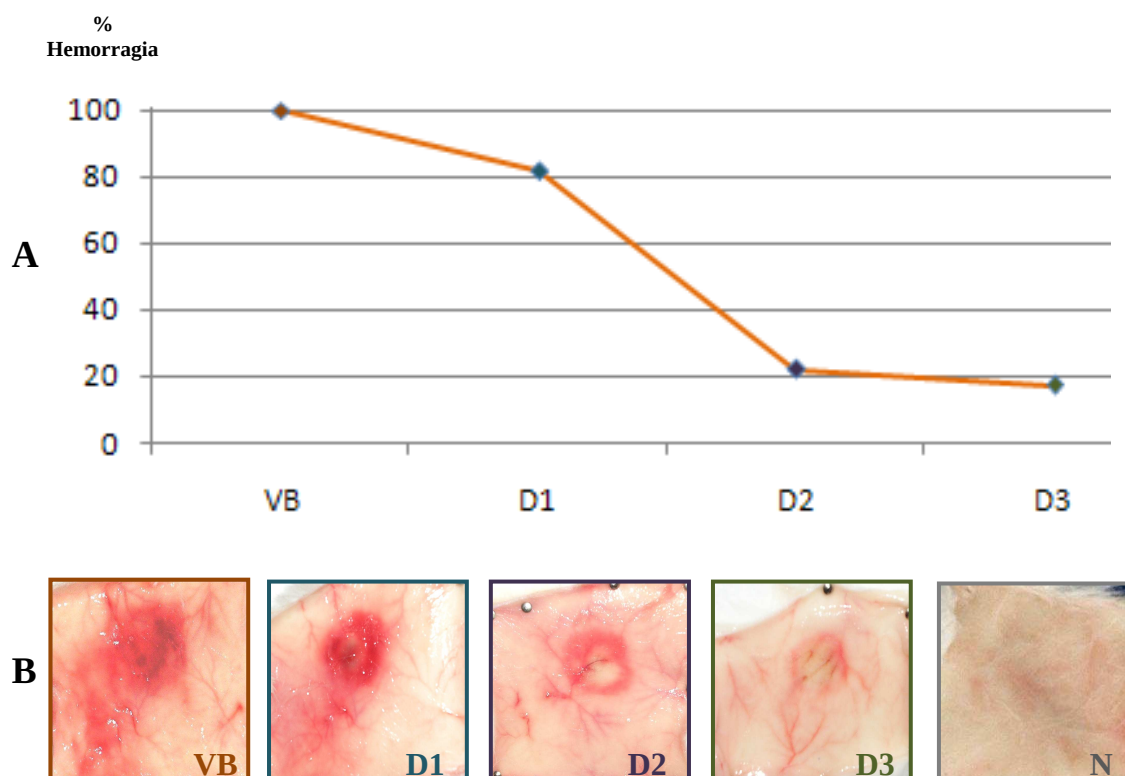


Figura 11 - Análise de inibição da atividade hemorrágica. A - representação gráfica, em porcentagem, da atividade hemorrágica obtida com a incubação da peçonha com diferentes concentrações de scFv. Os resultados mostrados foram calculados com utilização das medidas dos diâmetros dos halos hemorrágicos de cada amostra (três repetições para cada teste). VB indica o controle positivo constituído por 2 DMH (16,3 µg) de peçonha diluída em tampão fosfato, e o controle negativo (N) foi feito com tampão fosfato. D1, D2 e D3 representam amostras contendo peçonha/scFv nas proporções: 1/2, 1/5 e 1/10, respectivamente. B - Imagens mostrando a inibição da atividade hemorrágica, mediante aumentos nas concentrações dos anticorpos scFv.

Variações nas concentrações de scFv levaram a diferentes níveis de inibição: a razão 1/10 (peçonha/anticorpo) mostrou neutralização parcial dos

efeitos hemorrágicos, e, à medida que os anticorpos tornam-se mais diluídos, maiores são os efeitos hemorrágicos. Toxinas da peçonha provocam rompimento de vasos sanguíneos (hemorragia “per rexis”), contudo, os animais inoculados com anticorpo/peçonha nas proporções de 1/10 e 1/5 apresentam pequenos halos hemorrágicos (Figura 11- D2; D1). Este achado comprova o efeito protetor dos anticorpos avaliados.

6.8.2. Inibição da atividade miotóxica

A dosagem da enzima creatina quinase foi utilizada para se determinar a capacidade protetora do anticorpo em relação à atividade miotóxica, a qual é produzida por várias toxinas presentes na peçonha de *B. pauloensis*. Contudo, os resultados obtidos foram semelhantes aos observados no controle positivo, indicando ausência de interação entre scFv e as principais toxinas causadoras dos efeitos miotóxicos (dados não mostrados).

6.9. Inibição das atividades enzimáticas:

6.9.1 Inibição da atividade fibrinogenolítica

Os efeitos das moléculas scFvs sobre a atividade fibrinogenolítica da Neuwiedase podem ser observados na Figura 12. Os controles positivos mostram a capacidade da Neuwiedase e da peçonha em degradar as cadeias A α e B β do fibrinogênio após a incubação (linha 2). Nas linhas 3, 4 e 5 pode se observar a incubação do fibrinogênio com Neuwiedase-scFv (NEU) ou peçonha bruta-scFv (VB), nas concentrações respectivas de 1/2, 1/5 e 1/10 (toxina ou peçonha/scFv), resultando em aumentos na proteção da cadeia B β do fibrinogênio evidenciando a neutralização das toxinas fibrinogenolíticas da peçonha.

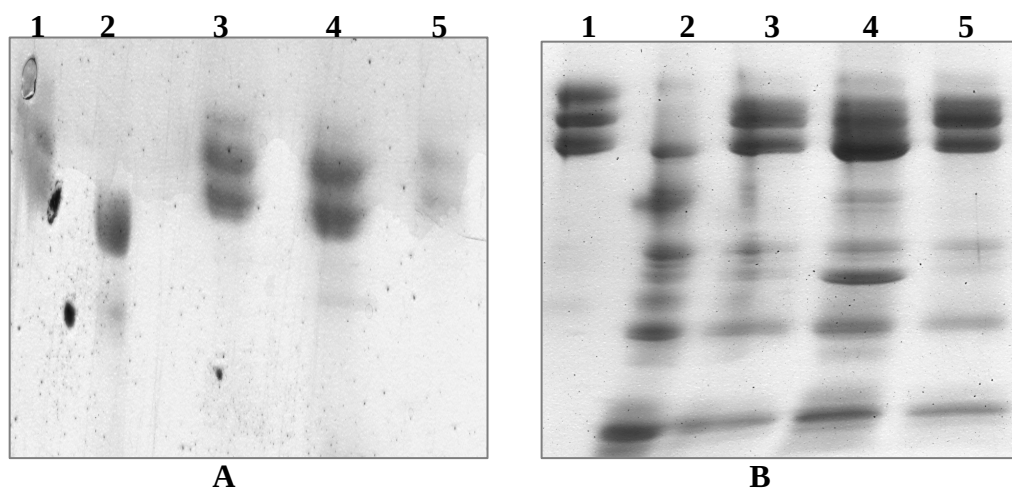


Figura 12- Inibição da atividade proteolítica da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e da Neuwiedase sobre fibrinogenio bovino. As amostras foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas com fibrinogênio (1,5mg/mL) por 2 horas a 37°C. SDS-PAGE (14%): 1- Fibrinogênio (15µg), 2- Neuwiedase (A) ou peçonha bruta de *B. pauloensis* (B) com fibrinogênio; as linhas 3, 4 e 5 contém Neuwiedase (A)/scFv ou peçonha (B)/scFv com fibrinogênio nas seguintes razões de toxina ou peçonha/scFV: 1/3, 1/5 e 1/10.

6.10. Inibição da atividade fosfolipásica

A Figura 13 mostra a hemólise produzida pela peçonha bruta de *B. pauloensis*. A capacidade de neutralização do scFv foi testada por incubação de 20 e 100µg destes anticorpos com peçonha bruta (10µg), a 37°C por 30 minutos. Em seguida, estas amostras foram incubadas em gel de agarose contendo eritrócitos de camundongo e emulsão de gema de ovo. O anticorpo mostrou-se incapaz de neutralizar a atividade fosfolipásica nas proporções utilizadas.

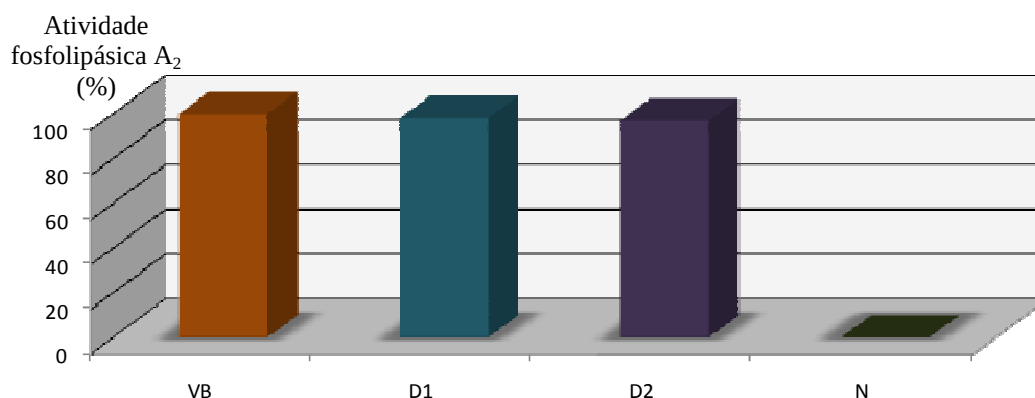


Figura 13 - Representação gráfica do ensaio de inibição da atividade fosfolipásica. Os resultados expressos foram calculados com base nas medidas dos halos formados após a incubação das amostras com o substrato (gel contendo gema de ovo e eritrócitos de camundongos). Os controles positivo (VB) e negativo (N) foram feitos com peçonha bruta e PBS, respectivamente. As amostras D1 e D2 (1/1 e 1/5 - m/m peçonha/scFv, respectivamente) mostraram resultados semelhantes aos observados sobre a hemólise causada pela peçonha.

7. DISCUSSÃO

Peçonhas de serpentes podem ser letais. Em geral são constituídas por várias proteínas com diversas funções. Essas proteínas formam uma complexa mistura que confere dificuldades na purificação e caracterização de seus componentes, isso gera complicações no desenvolvimento de alvos para terapias contra o envenenamento (WAGSTAFF 2006). Assim, a produção de anticorpos multipotentes é de grande valia para se desenvolver tratamentos mais efetivos. Atualmente, o uso de anticorpos monoclonais para fins terapêuticos representa um dos grandes alvos do mercado mundial de biofármacos (KASHMIRI *et al.* 2005), e muitas metodologias procuram desenvolver anticorpos terapêuticos obtidos de animais imunizados; porém estas imunoglobulinas devem evitar as reações imunológicas no organismo humano. A partir destes pressupostos, construímos uma biblioteca apresentada em fagos, *phage display*, de anticorpos (scFv) obtidos por imunizações em galinhas com peçonha bruta de *B. pauloensis*.

De acordo com o crescente número de publicações, anticorpos produzidos em galinhas podem ser utilizados em muitas aplicações, incluindo imunoterapias e imunodiagnósticos (AKITA & NAKAI 1992; KOKKO & KARENLAMPI 1992). Estudos relatando a produção de soros antiofídicos em galinhas comprovam a eficácia das IgYs em neutralizar os efeitos farmacológicos induzidos por peçonhas de serpentes, inclusive as brasileiras (ALMEIDA *et al.* 1998; DEVI *et al.* 2002; BRUNDA *et al.* 2006; PAUL *et al.* 2007; MEENATCHISUNDARAM *et al.* 2008). Assim, as galinhas apresentaram-se como uma fonte adequada de moléculas de mRNA, as quais codificam cadeias variáveis pesadas e leves de anticorpos, e estes mRNA foram utilizados na confecção da biblioteca de anticorpos. As aves são capazes de produzir anticorpos com alta afinidade, altos títulos e de grande persistência na resposta imune (LEMAMY *et al.* 1999), o que concorda com os elevados títulos obtidos neste trabalho frente à peçonha bruta de *B. pauloensis* (Figura 2). Outra vantagem obtida ao utilizarmos galinhas se deu pela maneira como a diversidade de anticorpos é gerada. Durante os rearranjos gênicos e o processo de conversão gênica, as cadeias leves e pesadas são geradas com as extremidades terminais apresentando seqüências de aminoácidos idênticas. Neste caso, o repertório de genes variáveis (VH e VL) pôde ser amplificado

utilizando apenas um par de iniciadores distintos para cada fragmento gênico (WYNGAARDT *et al.* 2004). Para amplificação dos segmentos gênicos de mamíferos, por exemplo, necessitaríamos de um maior número de oligonucleotídeos e de reações de amplificações (DANTAS-BARBOSA *et al.* 2004).

Utilizamos uma sequência nucleotídica para unir as cadeias leve e pesada do scFv que codifica um peptídeo com tamanho pequeno (*Short linker* - GGSSRS), o qual apresenta a capacidade de formar dímeros de scFvs (*diabodies*). Entretanto, quando se utiliza um peptídeo maior (*Long linker* - GGSSRSSSSGGGGSGGGG), é favorecida a formação de scFv monomérico (Holliger & Hudson, 2005). Esta diferença leva a desiguais habilidades de ligação, sendo, em geral o *diabody* portador de maior capacidade ligante devido a sua maior avidéz (ANDRIS-WIDHOPF *et al.* 2000).

Foram realizadas duas reações de ligação entre os genes scFvs e o vetor pComb3X com intuito de aumentar o tamanho inicial da biblioteca, pois sua dimensão é determinante na obtenção de anticorpos com alta afinidade e, em geral, bons resultados são obtidos com bibliotecas de tamanhos que variam entre 10^6 a 10^{10} (VAUGHAN *et al.* 1996; ITOH *et al.* 2003; DANTAS-BARBOSA *et al.* 2004). A biblioteca resultante contém 2×10^8 diferentes formas, estimadas pelo número de transformantes obtidos após sua clonagem no vetor pComb3X. Esta vasta diversidade somada ao fato de a biblioteca ser derivada de animais com altos títulos de anticorpos específicos para a peçonha bruta de *B. pauloensis*, e ainda, as reações de PCR promoverem arranjos aleatórios entre segmentos VH e VL, contribuíram para enriquecer o repertório de scFv, aumentando as possibilidades de encontrar anticorpos específicos a toxinas presentes na peçonha.

A variabilidade foi confirmada por análises das sequências encontradas na biblioteca não selecionada, das quais não se observaram pares VH/VL idênticos, assim, nenhum dos 40 clones avaliados compartilham a mesma sequência, caracterizando-se como clones únicos, com especificidades teoricamente distintas.

No repertório VL, analisado a partir de 40 clones escolhidos ao acaso, encontramos a mesma CDRL1 em 3 clones distintos, enquanto duas sequências

na CDRL2 repetiram uma vez, também em diferentes clones. Já para a CDRL3, não houve repetições. Provavelmente, a resposta imune contra peçonha pode ter direcionado a síntese de algumas CDRs específicas para toxinas altamente imunogênicas e/ou mais freqüentes na peçonha, isto explica a maior constância de algumas destas seqüências. Na linha germinativa, foram observados oito aminoácidos compondo a CDRL1, sete para a CDRL2 e 11 para a CDRL3. No entanto, o número variou entre sete e treze para CDRL1 nos clones seqüenciados, sendo que apenas 42,5% deles apresentaram oito aminoácidos nesta região e, da mesma forma, as CDRL 3 e 2 apresentaram 30 e 95%, respectivamente, dos números idênticos de aminoácidos observados para a linhagem germinativa.

As cadeias pesadas não apresentaram seqüências idênticas, porém, análogo ao encontrado para VL, os resíduos componentes de suas CDRs variaram em números quando comparados à seqüência da linhagem germinativa. Esses dados contribuem para afirmarmos a diversidade da biblioteca criada por recombinações gênicas, rearranjos e hipermutações somáticas intrínsecos ao animal. E pelos mecanismos de combinação aleatória entre VH e VL, favorecidos por reações de PCR, nesta conjuntura, podem também estar inclusos eventos de formação de híbridos entre duas diferentes cadeias leves resultados de reações PCR (ANDRIS-WIDHOPF *et al.* 2000). Estas análises asseguram a presença de anticorpos diversificados que compõem uma biblioteca com grande potencial de aplicação na seleção de formas ligantes a toxinas ofídicas e também em outros antígenos de interesse.

Para selecionar anticorpos monoclonais da biblioteca, foi utilizada peçonha bruta de *B. pauloensis*. Escolhemos esta estratégia devido à possibilidade de se obter uma molécula scFv com especificidade a várias toxinas distintas e/ou vários scFvs específicos a toxinas isoladas, evitando-se a restrição a um único antígeno. Os títulos de fagos-scFv ligantes observados mostraram enriquecimento do primeiro ao quarto ciclo de seleção, porém, os aumentos ocorridos entre os terceiro e quarto ciclos são pequenos, sugerindo que a quantidade de ciclos foi suficiente e a seleção eficaz (MCCAFFERTY *et al.* 1996).

O protocolo referente à expressão de scFv solúvel utilizado neste trabalho, e descrito por BARBAS *et al.* (2000), determina o crescimento dos clones por 16

horas antes da indução com IPTG. Porém, nesta pré-cultura não é sugerido o uso de glicose. Em geral, mesmo na ausência do indutor (IPTG), o promotor LacZ é capaz de conduzir a síntese de pequenas quantidades de scFv em níveis basais. Estas poucas moléculas podem apresentar toxicidade em graus variados para a célula e, devido a isso, o gene clonado pode ser excluído por recombinação gênica. A função da glicose nestas culturas é evitar esse tipo de pressão seletiva negativa, agindo como repressor metabólico para o gene *lacZ* (SAMBROOK *et al.* 1998). Talvez isto explique o fato de 100% dos fagomídeos obtidos no quarto, e 95,55% no terceiro ciclos de seleção clonados em TOP10, apresentarem seqüências de vetor pComb3X livres de insertos. Apesar de esta linhagem bacteriana possuir o gene *recA* mutado (*recA1*) para minimizar os eventos de recombinação, o fato de não utilizar glicose na fase exponencial de crescimento pode ter levado a perdas dos insertos e, com isso, os clones foram incapazes de expressar scFv em solução, o que reduziu a biblioteca selecionada do terceiro ciclo de 90 para quatro clones funcionais. Assim, houve queda nas possibilidades de encontrar anticorpos específicos e neutralizantes de toxinas.

A teórica seleção negativa obtida apresenta um lado prático, pois os clones positivos expressam moléculas scFv com menores toxicidades às bactérias; isso diminui as possibilidades de exclusão destes insertos por recombinação. Para assegurar a integridade do DNA, recomenda-se utilizar glicose até o momento da indução com IPTG. A partir daí, o meio contendo glicose deve ser substituído por outro contendo IPTG e livre de glicose. Além disso, a redução da temperatura de 37 para 30°C ocasiona diminuição na taxa de crescimento bacteriano, promovendo uma melhor produção de proteínas recombinantes.

Os quatro clones capazes de expressar scFv são diferentes e, todos aparecem fortemente marcados na membrana de *Dot blot* (Figura 6), porém, a marcação de C5 é visivelmente mais forte. Embora este ensaio seja, a princípio, não quantitativo, ele pode indicar o nível de produção de proteína recombinante dos clones analisados. Assim, aponta para maior capacidade produtiva do clone C5 em relação aos outros avaliados.

Fragmentos de anticorpos (Fab e scFv) isolados de outras bibliotecas *Phage display* são imunorreativos a toxinas das peçonhas de *Bothrops jararacussu* (TAMAROZZI *et al.* 2006) e *Crotalus durissus* (MENG *et al.* 1995).

Da mesma forma, neste trabalho, apesar de reduzidas as possibilidades devido ao restrito número de clones expressando scFv em solução, um deles (C5) mostrou-se imunorreativo às peçonhas brutas de *B. pauloensis* (Figura 7) e *B. alternatus* (Figura 8), tornando evidente o grande potencial da biblioteca como provável fonte de anti-venenos.

Esta antigenicidade cruzada entre componentes das peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* foi demonstrada por MOURA DA SILVA *et al.* (1990), por meio da técnica de *Western Blot*. O que sugere a existência de epítomos compartilhados nestas peçonhas. Provavelmente, os epítomos comuns decorrem do elevado grau de similaridades estruturais observadas entre as toxinas. As fosfolipases A₂, por exemplo, apresentam poucas variações de resíduos de aminoácidos entre as diferentes espécies botrópicas (NÚÑEZ *et al.* 2004). O mesmo fato ocorre em relação às metaloproteases (HARRISON, 2003).

Tanto a antigenicidade observada entre scFv (C5) e Neuwiedase (Figura 7), quanto o fato de que as metaloproteases ofídicas estão presentes em altas concentrações nas peçonhas Viperidae (MATSUI *et al.* 2000), nos instigou a investigar a ação do scFv sobre este tipo de toxina. Embora Neuwiedase seja classificada como metaloprotease PI (baixa massa molecular), sua estrutura possui muitas regiões comuns às outras toxinas PII, PIII e PIV; assim, essa enzima pode conter epítomos nas regiões conservadas, presentes também nas quatro classes de metaloproteases de peçonhas, permitindo desse modo o reconhecimento pelo mesmo anticorpo (HARRISON 2003).

Ampliando estas possibilidades, alguns trabalhos relatam a capacidade de anticorpos produzidos a partir de peçonhas de um gênero agirem cruzadamente com toxinas presentes em gêneros e famílias ofídicos diferentes das utilizadas na produção destes anticorpos (LIPPS; KHAN 2000). Como exemplo, citamos um monoclonal anti-jararagina, específico na região C-terminal do domínio desintegrina-símile de uma metaloprotease (Jararagina) da peçonha de *B. jararaca*. Este anticorpo reage contra duas peçonhas da família Colubridae (TANJONI *et al.* 2003). BEGHINI *et al.* (2005) confirmaram a habilidade de anti-soros produzidos em coelhos contra a crotoxina de *Crotallus durissus cascavella* em reconhecer a crotoxina de *C. d. terrificus* e BthTX-I de *B. jararacussu*. Ensaio de ELISA comprovou esta interação cruzada.

Em nosso estudo, após a seleção do clone imunorreativo, optamos por expressar o anticorpo em grande escala, seguido de purificação, usando coluna de afinidade. O protocolo de purificação do scFv em coluna de níquel apresentou eficiência e o rendimento foi satisfatório. Portanto, a interferência de outras proteínas contidas no meio de cultura foi eliminada a partir desse passo; além disso, as amostras puderam ser concentradas e, em seguida, diluídas nas concentrações desejadas.

Para avaliar a presença de anticorpos recombinantes nas frações derivadas da cromatografia, muitos autores realizam o teste de ELISA (DANTAS-BARBOSA *et al.* 2004; TAMAROZZI *et al.* 2006), no entanto, constatamos a existência da proteína recombinante nas frações cromatográficas por *Dot blot*, esta estratégia mostrou-se prática, rápida e fácil de realizar, além de utilizar pouco material (amostra e reagentes), quando comparada com o teste de ELISA.

As regiões comuns entre Neuwiedase e outras metaloproteases botrópicas, juntamente com a antigenicidade observada na Neuwiedase ao scFv, estimularam a busca por outras toxinas antigênicas ao scFv, constituintes da peçonha de *B. pauloensis*.

A capacidade do scFv (C5) em reconhecer diferentes componentes da peçonha de *B. pauloensis* foi confirmada pelo *Western Blot*. Notou-se a presença de bandas antigênicas ao scFv com diferentes massas moleculares, mostrando uma reatividade cruzada entre estes componentes (Figura 10). Da peçonha de *B. pauloensis*, já foram isoladas três metaloproteases da classe PI, a saber Neuwiedase com 24kDa, BnP1 e BnP2 com 22kDa (RODRIGUES *et al.* 2000; BALDO *et al.* 2008), todas com baixa atividade hemorrágica. Dois fatores hemorrágicos também foram encontrados nesta mesma peçonha e apresentam massas moleculares de 46 (NHFa) e 58 kDa (NHFb). Apesar disto, este teste não permite a identificação das toxinas reconhecidas pelo anticorpo, mas confirma que as proteínas reconhecidas pelo anticorpo apresentam massas moleculares semelhantes às encontradas para metaloproteases das classes PI e PIII.

O scFv foi incapaz de inibir as atividades miotóxica e fosfolipásica indireta (Figura 13), porém, os efeitos hemorrágico (Figura 11) e fibrinogenolítico (Figura 12), intrínsecos à peçonha de *B. pauloensis* e à Neuwiedase, foram neutralizados. Estes resultados, em conjunto com os testes de ELISA (Figura 7) e *Western Blot*

(Figura 10), confirmaram a especificidade do anticorpo para as metaloproteases presentes na peçonha de *B. pauloensis*. Pois, estas toxinas representam os principais componentes causadores dos efeitos hemorrágicos locais e/ou sistêmicos da peçonha (BJARNASON, FOX 1994). Além disso, distúrbios da coagulação observados nos envenenamentos por esta peçonha, geralmente são devidos à ação de metaloproteases fibrino(geno)líticas (BRAUD *et al.* 2000; MATSUI *et al.* 2000).

Anticorpos monoclonais são importantes instrumentos para se identificar epítomos conservados em muitas proteínas. Estas imunoglobulinas podem reconhecer pequenas diferenças existentes num grupo de proteínas, como as metaloproteases de peçonhas. Prova disso é o monoclonal anti-Jararagina, mencionado anteriormente, que reconhece um epítomo conservado, presente em 27 espécies de serpentes das famílias Viperidae e Colubridae (TANJONI *et al.* 2003). De maneira semelhante, a maioria dos estudos envolvendo mecanismos de ação das metaloproteases ofídicas destaca a importância do domínio desintegrina-símile e da região rica em cisteína para a atividade hemorrágica destas enzimas. Todavia, o scFv neutralizou a hemorragia da peçonha, ou seja, bloqueou a ação das metaloproteases altamente hemorrágicas, as quais contêm os domínios citados acima. Ao mesmo tempo este anticorpo reconhece e bloqueia metaloproteases da classe PI, como a Newiedase que apresentam apenas o domínio catalítico. Assim, fica sugerida o reconhecimento do paratopo scFv (C5) ao domínio catalítico e a importância de novos estudos para avaliar interações entre estes domínios na ação hemorrágica.

Embora muitas metaloproteases pertencentes ao gênero *Bothrops* tenham sido identificadas e caracterizadas, pouco se conhece a respeito destas enzimas na peçonha de *B. pauloensis*. Assim, novos conhecimentos sobre estas toxinas aumentam as possibilidades de desenvolver formas terapêuticas alternativas ou de aprimorar as já existentes.

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de macromoléculas, com vários epítomos capazes de estimular muitos clones de anticorpos secretados por linfócitos. A maioria dos anti-venenos comerciais existentes é de origem eqüina e constituídos por IgG intactas ou por fragmentos F(ab)2. Apenas 5 a 13% dos anticorpos, ou fragmentos destes, ligam-se especificamente aos

componentes tóxicos da peçonha usados para imunizar o cavalo (SJÖSTROM *et al.*, 1994). Por isso, ocorre o contato da vítima de envenenamento com uma grande quantidade de imunoglobulinas heterólogas ao seu organismo, muitas delas sem ação sobre a peçonha (THEAKSTON & REID 1983). Por consequência, há aumento nas possibilidades de choque anafilático, doença do soro e efeitos adversos (WAGSTAFF 2006). Porém, a utilização de anticorpos reconhecidamente específicos, como possivelmente o scFv (C5), reduzem as quantidades de imunoglobulinas utilizadas, diminuindo o contato do paciente com proteínas heterólogas ao seu organismo.

Por outro lado, a produção de soros antiofídicos com o uso de animais envolve a inoculação de peçonha bruta e, devido à alta toxicidade da peçonha e também pela utilização de adjuvantes, estes animais apresentam declínio de suas resistências orgânicas, que pode resultar em óbito; em torno de 10% dos animais utilizados na produção de soro morrem durante o processo (RIBEIRO *et al.* 1993). Em contraste, a síntese de fragmentos de anticorpos pode ser realizada também por vegetais geneticamente modificados, tais como tabaco, soja, batata, alfafa dentre outros (GOLDSTEIN & THOMAS 2004). E, em geral, as quantidades produzidas por vegetais apresentam-se superiores quando comparadas à produção animal. Estes fatos viabilizam os investimentos empregados em tecnologias de engenharia genética para produção destas moléculas recombinantes.

8. Conclusões

As etapas de amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos de imunoglobulinas de galinhas foram bem sucedidas e a biblioteca resultante possui grande quantidade e variabilidade de formas.

A utilização da biblioteca de fragmentos scFvs em fagos por quatro ciclos de seleção mostrou enriquecimento nos títulos de fagos selecionados contra a peçonha bruta de *B. pauloensis*.

A metodologia utilizada para expressar moléculas scFvs solúveis teve baixa eficácia devido a perdas dos genes clonados no vetor pComb3X.

Ensaio mostraram a capacidade antigênica e neutralizante do scFv (C5) contra metaloproteases presentes na peçonha de *B. pauloensis*, inibindo as atividades hemorrágica e fibrinogenolítica da peçonha e da Neuwiedase.

9. Perspectivas

Testar a capacidade neutralizante do scFv (C5) frente a ensaios de letalidade da peçonhas bruta.

Determinar o epítipo do scFv (C5) por seleção de peptídeos recombinantes em bibliotecas *Phage display* e buscar as toxinas ligantes ao anticorpo por seqüenciamento de proteínas.

Buscar imunorreatividade cruzada entre scFv (C5) e toxinas presentes em peçonhas de espécies e gêneros distintos da *B. pauloensis*.

Identificar antígenos recombinantes imunorreativos ao scFv (C5).

Clonar o gene do scFv (C5) em vetores que permitam a expressão desta molécula por vegetais como tabaco.

Utilizar a biblioteca para selecionar moléculas scFvs neutralizantes das ações miotóxica, hemolítica, inflamatória e necrosante, presentes em envenenamentos por peçonha de *B. pauloensis* e de outras serpentes.

10. Referências

ADRIS-WIDHOPF, J., RADER, C., STEINBERGER, P., FULLER, R., BARBAS, F., C. **Methods for the geration of chicken monoclonal antibody fragments by phage display.** J. Imm. Meth.. v.242, p.159-181. 2000.

AKATSUKA, K. **Immunological studies of snake venoms.** Jpn. J. Exp. Med. v.14, p.147-183, 1936.

AKITA, E. M., NAKAI, S. **Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification.** J. Food. Sci. p.57:629, 1992.

ALMEIDA, C. M., KANASHIRO, M. M., RANGEL FILHO, F. B., MATA, M. F., KIPNIS, T. L., DIAS DA SILVA, W. **Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk.** Vet. Rec. v.143, n.21, p.579–584, 1998.

AZEVEDO, M. O., FELIPE, M. S. S., BRÍGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q., DE-SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em biologia molecular.** ed. Universidade de Brasília. p.129-141, 2003.

BALDO, C., TANJONI, I., LEÓN, I.R., BATISTA, I. F. C., DELLA-CASA, M. S., CLISSA, P. B., WEINLICH, R., LOPES-FERREIRA, M., LEBRUN, I., AMARANTE-MENDES, G. P., RODRIGUES, V. M., PERALES, J., VALENTE, R. H., MOURA-DA-SILVA, A. M. **BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP.** Toxicon v.51, p.54-65, 2008.

BARBAS, C. F., DENNIS, R. B., SCOTT, J. K., SILVERMAN, G. J. **Phage Display A laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 ed. NY, 2001.

BUGLI, F., GRAFFEO, R., STERBINI, F. P., TORELLI, R., MASUCCI, L., SALI, M., GRASSO, A., RUFINI, S., RICCID, E., FADDA, G., PESCATORI, M. **Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice.** Toxicon n.51, p.547–554, 2008.

BEGHINI, D. G., DA CRUZ-HOFLING, M. A., RANDAZZO-MOURA, P., RODRIGUES-SIMIONI, L., NOVELLO, J. C., HYSLOP, S., MARANGONI, S. **Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom.** Toxicon v.46, n.6, p.604-11, 2005.

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

BRAUD, S., BOM, C., WISNER, A. **Snake venom proteins action on hemostasis.** Biochimie v.82, p.851-859, 2000.

BRUNDA, G., SASHIDHAR, R. B., SARINB, R. K. **Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom in biological samples of forensic origin.** Toxicon. v.48, p.183–194, 2006.

DANTAS-BARBOSA, C., LIMA, L. M., ALBUQUERQUE, F. C., COSTA, C. S., VIEIRA, P. M. M. M., BRÍGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q. **Bibliotecas Combinatórias de Anticorpos Apresentadas em Fagos – Construção e Utilização.** Biosci. J. Uberlândia, Especial, p.17-29, 2004.

DEVI, C. M., BAI, M. V., LAL, A. V., UMASHANKAR, P. R., KRISHNAN, L. K. **An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk.** J. Biochem. Biophys. Methods, v.51, p.129–138, 2002.

EWING, B., GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.** Genome Res. n.8, p.186-194, 1998.

FERREIRA, R. N., MACHADO DE AVILA, R. A., SANCHEZ, E. F., MARIA, W. S., MOLINA, F., GRANIER, C., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. **Antibodies against synthetic epitopes inhibit the enzymatic activity of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom.** Toxicon v.48, p.1098–1103, 2006.

FLEXNER, S. & NOGUCHI, H. **Upon the production and properties of anti-crotalus venin.** J. Med. Res. v.11, p.363-376, 1904.

GOLDSTEIN, D. A. & THOMAS, J. A. **Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants.** Q J Med. v.97, p.705–716, 2004.

SJOSTROM, L., AL-ABDULA, I. H., RAWAT, S., SMITH, D.C., LANDON, J. **A comparison of ovine and equine antivenoms.** Toxicon n.32, p.427-433, 1994.

GUTIÉRREZ, J. M. & RUCAVADO, A. **Snake venoms metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage.** Biochimie n.82, p.841–850, 2000.

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

HOLLIGER, P., HUDSON, P. J. **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** Nature Biotechnol v.23, n.9, p.1126-1136, 2005.

ITOH, K., INOUE, K., TEZUKA, T., TADA, H., HASHIMOTO, Y., MASUKO, T., SZUKI, T. **Molecular structural and functional characterization of tumor suppressive anti-ErbB-2 monoclonal antibody by Phage Display system.** J. Biochem. (Tokyo) v.133, p.239-245, 2003.

JIANXIN, M, JOHN, T. R., KAISER, I. I. **Specificity and binding affinity of an anti-crotoxin combinatorial antibody selected from a Phage display library.** Bioch. Pharm. v.50, n.12, 1995.

JUAREZ-GONZALEZ, V. R., RIANO-UMBARILA, L., QUINTERO-HERNANDEZ, V., OLAMENDI-PORTUGAL, T., ORTIZ-LEON, M., ORTIZ, E., POSSANI, L. D., BECERRIL, B. **Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2.** J. Mol. Biol. v.346, p.1287–1297, 2005.

KASHMIRI, S. V. S., PASCALIS, R. D., GONZALES, N. R., SCHLOM, J. S. R. D. **Grafting - a new approach to antibody humanization.** Methods. v.36, p.25-34, 2005.

KOKKO, H. & KARENLAMPI, S. O. **Antibody from hen's eggs against a conserved sequence of gametophytic selfincompatibility proteins of plants.** Anal. Biochem. p.201-311, 1992.

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

LAING, G. D. & MOURA-DA-SILVA, A. M. **Jararhagin and its multiple effects on hemostasis.** Toxicon n.45, p.987–996, 2005.

LAMB, G. **On the precipitin of cobra venom: a means of distinguishing between the proteins of diferent poisons.** Lancet I. p.431-435, 1902.

LICE, A. F., BECERRIL, B., POSSANI, L. D. **Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius hoffmann*.** Toxicon v.34, n.8, p.843-847, 1996.

LIPPS, B. V. KHAN, A. A. **Antigenic cross reactivity among the venoms and toxins from unrelated diverse sources.** Toxicon v.38, n.973-980, 2000.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. **Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis.** Biochim. Biophys. Acta v.1477, p.146–156, 2000.

MCCAFFERTY, J., HOOGENBOOMN, H. R., CHISWELL, D. J. **Antibody Engineering, A Practical Approach**, 1 ed., Oxford Univ. Press, Oxford, 1996.

MEENATCHISUNDARAM, S., PARAMESWARI, G., MICHAEL, A., RAMALINGAM, S. **Studies on pharmacological effects of Russell's viper and**

Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. Int. Immunoph. v.8, p.1067–1073, 2008.

MENG, J., JOHN, T. R., KAISER, I. I. **Specificity and binding affinity of anti-crotoxin combinatorial antibody selected from a Phage-Displayed library.** Biochem. Pharmacol. v.50, n.12, p. 1969-1977, 1995.

MOURA-DA-SILVA, A. M., D'IMPERIO, L. M. R., NISHIKAWA, A. K., BRODSKYN, C. I., DOS SANTOS, M. C., FURTADO, M. D. F., DIAS DA SILVA, W., MOTA, I. **Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus Bothrops.** Toxicon v.28, n.2, p.181-188, 1990.

MOUSLI, M., DEVAUX, C., ROCHAT, H., GOYON, M., BILLIALD, P. **A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector.** FEBS Letters v.442, p.183-188, 1999.

MOUSLI, M., GOYON, M., BILLIALD, P. **Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis*.** Biochim. Biophys. Acta v.1425, p.348-360, 1998.

NÚÑEZ, V., ARCE, V., GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. **Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*.** Toxicon v.44, n.6, p. 91-101, 2004.

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

PAUL, K., MANJULA, J., DEEPA, E. P., SELVANAYAGAM, Z. E., GANESHC, K. A., RAO, P. V. S. **Anti-*Echis carinatus* venom antibodies from chicken egg yolk:Isolation, purification and neutralization efficacy.** Toxicon v.50, p.893–900, 2007.

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.** Arch. Biochem. Biophys. v.381, n.2, p.213–224, 2000.

RODRIGUES, V.M., SOARES, A.M., MANCIN, A.C., FONTES, M. R. M., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J.R. **Geographic variations in the composition composition of myotoxins from *bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity.** Comp. Biochem. Physiol. v.121, p.215-222, 1998.

ROODT, A. R., DOLAB, J. A., FERNANDEZ, T., SEGRE, L., HAJOS, S. E. **Crossreactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina.** Toxicon v.36, n.7, p.1025-38, 1998.

RUSSEL, F. E. **Snake venom immunology: historical and practical considerations.** J. Toxicol.Toxin. Rev. v.7, p.1-82, 1988.

SACHDEV, S. S. & FELLOUSE, F. A., **Synthetic therapeutic antibodies.** Nat. Chem. Biol. p.682-688, 2006.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATS, E. **Molecular Cloning: A Laboratorial Manual.** Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

SELISKO, B., COSÍO, G., GARCÍA, C., BECERRIL, B., POSSANI, L. D., HORJALES, E. **Bacterial expression, purification and functional haracterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmann*.** Toxicon v.43, p.43–51, 2004.

TANJONI, I., BUTERA, D., SPENCER, P. J., TAKEHARAA, H. A., FERNANDES, I., MOURA-DA-SILVA, A. M. **Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity.** Toxicon v.42, p.809–816, 2003.

TAMAROZZI, M. B., SOARES, S. G., MARCUSSI, S., GIGLIO, J. R., BARBOSA, J. E. **Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom.** Biochim. Biophys. Acta v.1760, p.1450–1457, 2006.

THALLAY, B. S., CARROLL, S. B., **Rattle snake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens.** Biotechniques v.8, p.934–938, 1990.

THEAKSTON, R. D. G., REID, H. A. **Development of a simple assay procedure for the characterisation of snake venoms.** Bull WHO. n.61, p.949–956, 1983.

VAUGHAN, T. J., WILLIAMS, A. J., PRITCHARD, K., OSBOURN, J. K., POPE, A. R., EARNSHAW, J. C., MCCAFFERTY, J., HODITS, R. A., WILTON, J., JOHNSON, K. **Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized Phage Display library.** Nat. Biotechnol. v.14, p.309-314, 1996.

WAGSTAFF, S. C., LAING, G. D., THEAKSTON, R. D. G., PAPASPYRIDIS, C., HARRISON, R. A. **Bioinformatics and multi-epitope DNA immunization to design rational snake antivenom.** PLOS Medicine. v.3, n.6, p.184, 2006

WYNGAARDT, W. V., MALATJI, T., MASHAU, C., FEHRSEN, J., JORDAAN, F., MILTIADOU, D. R., PLESSIS, D. H. **A large semi-syntetic single-chain Fv phage display library based on chicken immunoglobulin genes.** BMC Biotechnol. v.2, n.4, p.1-44, 2004.