

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE BIOMEDICINA

JULIANA PASINI DE SOUZA

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM EPÍTOPO CONFORMACIONAL DA
CROTOXINA, UMA NEUROTOXINA PRESENTE NO VENENO DA SERPENTE**

Crotalus durissus terrificus

CRICIÚMA

2016

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE BIOMEDICINA

JULIANA PASINI DE SOUZA

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM EPÍTOPO CONFORMACIONAL DA
CROTOXINA, UMA NEUROTOXINA PRESENTE NO VENENO DA SERPENTE**

Crotalus durissus terrificus

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para aprovação na disciplina de TCC II no curso de Biomedicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Co-orientadora: Msc Adriani Paganini Damiani

CRICIÚMA

2016

JULIANA PASINI DE SOUZA

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM EPÍTOPO CONFORMACIONAL DA
CROTOXINA, UMA NEUROTOXINA PRESENTE NO VENENO DA SERPENTE
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS**


Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
pela Banca Examinadora para obtenção do
Grau de Bacharel no Curso de Biomedicina da
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
UNESC.

Criciúma, Novembro de 2016.

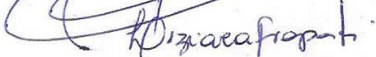
BANCA EXAMINADORA



DR. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA – Orientador



Dr. Cláudio Teodoro de Souza



Me. Lizara Silva Fraport

APRESENTAÇÃO

A monografia foi elaborada seguindo as normas ABNT. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Extremo Sul Catarinense com apoio dos agentes financiadoras CNPq, CAPES e FAPESC.

**Dedico este estudo aos
meus pais e meu irmão, por
todo o apoio para ir em
busca do meu sonho.**

AGRADECIMENTOS

Ao longo do desenvolvimento deste projeto contei com a colaboração de muitas pessoas que diretamente ou indiretamente me ajudaram na conclusão.

Á Deus pela força e perseverança para continuar e por sempre estar presente na minha vida;

Aos meus pais por todo apoio emocional e financeiro e por terem acreditado em mim e me dado força para continuar desde o início;

Ao meu orientador, professor e Doutor Ricardo Andrez Machado de Ávila que me apresentou a ciência e me mostrou o que é a pesquisa através deste projeto. Dono de uma inteligência inexplicável e admirável, com alegria, ironias e bom humor sempre esteve presente transferindo seu conhecimento e ensinando de uma maneira jamais vista. Eu serei eternamente grata por tudo.

Á minha co-orientadora Adriani, com toda paciência, atenção e dedicação foi fundamental no desenvolvimento e realização deste projeto;

Ao Jhonatam Possato, com toda sua inteligência sempre esteve disposto a me ajudar e ensinar principalmente nos cálculos matemáticos;

Á Marcia Pereira, a dona do mundo da Bioinformática, com toda paciência me mostrou e ensinou como fazer parte desta área tão complexa e interessante e a ajuda constante não só nesse projeto mas também em toda a minha vida de iniciação científica; eu serei eternamente grata.

A Emily, Amanda, Nathália, Bethina, Mirian, Rafael, Rhaisa, Jhonny e Luíza que sempre estiveram dispostos a me ajudar e dividir seus conhecimentos e os amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular - LABIM que sempre estiveram dispostos a melhorar o nosso cotidiano laboratorial com dedicação e paciência;

Aos funcionários do Biotério pela amizade e serviços prestados;

Á FUNED por fornecer as amostras de soro utilizadas neste estudo.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”

(Aristóteles)

RESUMO

A serpente *Crotalus durissus terrificus* pertencente à família Viperidae é a espécie mais amplamente distribuída pela América do Sul e responsável pelo maior coeficiente de letalidade. Dentre as toxinas que compõe o veneno, a que apresenta maior atividade tóxica e que representa 65% da sua composição é a crotoxina. Na ocorrência de acidentes o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é a Imunoterapia que utiliza soros produzidos em cavalos para neutralizar a ação do veneno. Porém, a dificuldade em se obter um soro puro e em grande escala, torna necessária a busca por alternativas através de moléculas que apresentam o mesmo efeito da crotoxina. Os epítomos, também conhecidos como determinantes antigênicos, podem ser definidos como um grupo de aminoácidos derivados de antígenos proteicos, que podem interagir com receptores de células B ou com os receptores de célula T, resultando em uma resposta imune. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma molécula que tenha capacidade de ligar-se ao soro comercial anticrotálico. Foi realizada a caracterização e síntese de epítomos conformacionais da crotoxina, através de ferramentas de bioinformática e síntese *in vitro* de peptídeos utilizando a técnica de Fmoc. Esse epítomo na forma de peptídeo foi utilizado como antígeno para realização do teste de ELISA. Nossos resultados em relação à predição molecular realizada através de programas de bioinformática demonstraram que o peptídeo da crotoxina encontra-se exposto na superfície da molécula sendo acessível à ligação de anticorpos. Em relação aos resultados obtidos pelo teste de ELISA, observamos que o peptídeo sintetizado foi capaz de reconhecer o soro anticrotálico. Em virtude disto, o modelo tridimensional da crotoxina, mostrou-se confiável, resultando em um epítomo neutralizante, sendo então considerado uma molécula capaz de ser utilizada no sorodiagnóstico de acidentes com a serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Palavras-chave: Serpente. Veneno. Crotoxina. Epítomo. Antiveneno.

ABSTRACT

The Serpent *Crotalus durissus terrificus*, belonging to the Viperidae family is the most widely distributed species in South America and responsible for the highest coefficient of lethality. The main toxins that make up the venom of this species of snake are: crotoxin, crotamine, convulxine and gyroxin. Among these toxins, which has the highest toxic activity and which makes up 65% of the composition of the venom is crotoxin. In the occurrence of accidents the treatment recommended by the Ministry of Health is the immunotherapy that uses sera produced in horses to neutralize the action of the venom. However, the difficulty in obtaining a pure and large scale serum requires a search for alternatives for molecules that have the same effect as crotoxin. Epitopes, also known as antigenic determinants may be defined as a group of amino acids derived from protein antigens, which may interact with B cell receptors or T cell receptors, resulting in an immune response. The aim of this work was to develop a molecule capable of replacing the use of crude venom in the equine immunization processes. Was performed the characterizing and synthesis of the conformational epitopes of crotoxin through bioinformatic tools and in vitro synthesis of peptides using the Fmoc technique. Our results regarding molecular prediction performed through bioinformatic programs have demonstrated that the crotoxin peptide is exposed on the surface of the molecule being accessible to antibody binding. In relation the results obtained by the ELISA test, we observed that the synthesized peptide was capable of recognizing the anti-crotalic serum. As a result, the three-dimensional model of crotoxin proved to be reliable, resulting in a neutralizing epitope, being considered a molecule capable of being used in the serodiagnosis of accidents with the *Crotalus durissus terrificus* snake.

Keywords: Serpent. Venom. Crotoxin. Epitope. Antivenom.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática dos diferentes tipos de epítomos.....	17
Figura 2 - Representação esquemática da interação antígeno-anticorpo.....	18
Figura 3 – Estrutura tridimensional da Crotoxina (PDB: 3R0L e resolução de 1.35Å).....	27
Figura 4 - Sequência de 122 aminoácidos da crotoxina, cadeia D, identificados no PDB de código 3R0L.....	27
Figura 5 – Figura ilustrativa da visualização dos parâmetros de cada aminoácido em uma estrutura de uma proteína.....	28
Figura 6 – Aminoácidos mais acessíveis da crotoxina fornecidos pelo <i>Sting Millennium</i>	29
Figura 7 – Epítomo conformacional predito da crotoxina. Em vermelho os resíduos de aminoácidos selecionados pelo programa <i>Sting Millennium</i> e em amarelo estão os resíduos de aminoácidos utilizados para a ligação dos resíduos e desenho do peptídeo.....	30
Figura 8 – ELISA indireta da titulação do peptídeo da crotoxina frente ao antiveneno (anticrotálico) produzido pela FUNED.....	32
Figura 9 – Comparação da reatividade entre controle negativo, peptídeo e veneno frente o soro anti-crotálico.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SAC= Soro Anticrotalítico

PLA2= Fosfolipase

PDB = Protein Data Bank

DIPC= Diisopropilcarbodiimida

DMF= Dimetilformamida

ELISA= *Enzyme linked immunosorbent assay*

OPD = Ortofenildiamina

F-Moc = Fluorenil metil oxicarbonila

PBS= *Phosphate buffer saline*

PDB = Protein Data Bank

JPD= Java Protein Dossier

SPDBV = Swis PDB Viwer

C.d. terrificus= *Crotalus durissus terrificus*

UNESC- Universidade do Extremo Sul Catarinense

FUNED= Fundação Ezequiel Dias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O OFIDISMO: CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS	12
1.2 CONSTITUINTES DO VENENO	14
1.3 INTERAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO	16
1.3.1 ANTÍGENO E ANTICORPO	16
1.3.2 EPÍTOPOS E SEU MAPEAMENTO	16
1.3.3 BIOINFORMÁTICA	19
1.3.4 BIOINFORMÁTICA NA PRODUÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS	20
2 METODOLOGIA	22
2.1. BANCO DE DADOS	22
2.2. PREDIÇÃO DE EPÍTOPO E DESIGNER DO PEPTÍDEO	22
2.3. SÍNTESE SOLÚVEL DO PEPTÍDEO	23
2.4. ELISA	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4 CONCLUSÃO	34
5 REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 O OFIDISMO: CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS

A serpente *Crotalus durissus terrificus* pertence à família Viperidae é popularmente conhecida por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boincininga, maracambóia, dentre outras. É a espécie de cascavel mais amplamente distribuída, habitando desde o México á Argentina, sendo que são reconhecidas na América do Sul nove subespécies. Esta espécie é comum principalmente em vegetação seca e abertas do cerrado (BASTOS; ARAUJO; SILVA, 2005). No Brasil são encontradas cinco subespécies distribuídas ao longo do território: *Crotalus durissus terrificus* é a mais comum na região Sul; na região da Caatinga a espécie mais comum é *Crotalus durissus cascavel*; *Crotalus durissus collineatus* é mais encontrada na região central e norte; *Crotalus marajoensis durissus* no cerrado e *Crotalus durissus ruruima* encontrada principalmente no estado de Roraima (GUIDOLIN et al., 2013).

A característica marcante deste gênero é a presença de um guizo (chocalho) localizado na ponta da cauda que emite um ruído, facilitando sua identificação e presença. Possui um corpo de fundo castanho-claro com manchas dorsais em forma de losango de cor marrom, marginadas de branco e amarelo (CARDOSO et al., 2003). Apresenta ainda, características semelhantes ás serpentes peçonhentas, como a cabeça triangular, um par de fossetas loreais (órgão sensorial termorreceptor), olhos pequenos com pupilas em fenda, escamas e dentes inoculadores de veneno (CUNHA; MARTINS 2012).

Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude de sua frequência e gravidade. Os envenenamentos por serpentes peçonhentas no Brasil são causados além da *Crotalus*, pelos gêneros *Lachesis*, *Bothrops* e *Micrurus* (PARDAL et al., 2007). A peçonha crotalítica é uma mistura complexa de proteínas e polipeptídios sendo responsável por ações neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes. (PARDAL et al., 2007).

O envenenamento pela *Crotalus durissus terrificus* pode apresentar apenas alguns sintomas locais como parestesia local sem edema, sendo que a dor e o eritema são mais discretos quando presentes. Os sintomas sistêmicos são mal-estar, náusea, vômito, cefaléia, prostração e sonolência; já os sintomas neurológicos

ocorrem nas primeiras seis horas após a picada. As manifestações clínicas devido à ação miotóxica são, mialgia, urina escura, oligúria e principalmente insuficiência renal aguda; além da ptose palpebral e flacidez da musculatura da face (fáceis miastenias) levando a dificuldades de manter a boca fechada, e um aumento no tempo de coagulação e sangramento devido a ação coagulante (PARDAL, 2007).

Após ocorrer o acidente ofídico o tratamento mais específico é a imunoterapia com soro anticrotálico (SAC) endovenosamente, a dose a ser utilizada varia de acordo com a gravidade. É recomendado fazer assepsia da região com água e sabão e analgesia, além da hidratação para prevenir a insuficiência renal (PINHO; PEREIRA, 2001). A imunoterapia com o SAC que apresenta alto teor de anticorpos é o principal e o mais eficiente tratamento contra o envenenamento. Os anticorpos neutralizam os efeitos tóxicos do veneno, promovendo uma rápida depuração, além da neutralização e bloqueio dos sítios catalíticos dos componentes tóxicos do veneno. Apesar disso, muitos estudos têm relatado que o SAC possui baixo teor de anticorpos quando comparado a os outros soros ofídicos que possuem componentes com atividades imunossupressoras (SANTOS et al., 2004).

De maneira geral, atualmente, a produção do soro continua a mesma que foi proposta por Albert Calmette (1863-1933) no final do século XIX, onde o veneno é extraído da serpente, recebe substâncias adjuvantes para aumentar seu potencial antigênico e posteriormente é inoculado subcutaneamente em doses de concentrações crescentes em cavalos. O animal fornece grande volume de sangue rico em anticorpos e por meio de uma sangria é retirado cerca de doze litros de sangue; o plasma é retirado e levado para seção de concentração, purificação e fracionamento, onde é feita a eliminação de proteínas inativadas e as gamaglobulinas de interesse são mantidas.

No entanto, apesar dos benefícios que o soro pode gerar, algumas pessoas após a administração do mesmo, podem apresentar complicações como choque anafilático e a doença do soro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

1.2 CONSTITUINTES DO VENENO

As peçonhas das serpentes apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e são uma mistura complexa de proteínas; possuem também, diferentes composições químicas, ocasionando variações das propriedades biológicas, toxicidade e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Essa mistura de proteínas compreende uma boa parte do peso seco do veneno, incluindo enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas, já a parte não proteica, é composta de cátions, aminas, lipídeos dentre outros (CUNHA; MARTINS, 2012).

A análise citogenética da toxicologia dos venenos de animais e suas proteínas isoladas são de grande importância para a identificação e caracterização de potenciais agentes terapêuticos permitindo uma melhor compreensão do mecanismo dessas toxinas no corpo humano (MARCUSSEI et al., 2011). O veneno da *Crotalus durissus terrificus* apresenta várias proteínas biologicamente ativas, tendo principal destaque a crotoxina, crotamina, convulxina e a giroxina (BARROS et al., 2015).

A crotamina é potencialmente menos tóxica que a crotoxina, porém, sua ação é específica sobre a membrana muscular esquelética, provocando estado de fibrilação com contrações curtas e relaxamento demorado (LAGO et al; 2003). A crotamina é considerada um polipeptídeo de baixo peso molecular, formado por quarenta e dois aminoácidos, e também uma miotoxina responsável pela mionecrose no tecido muscular e paralisia espasmódica em músculos de origem periférica através da despolarização do potencial de membrana das células musculares, quando em baixas concentrações pode induzir analgesia (CUNHA; MARTINS, 2012).

A giroxina foi identificada primeiramente pela sua capacidade de induzir perda de equilíbrio, tonturas, labirintite, contrações musculares sistêmicas, além da atividade de protrombina (GUIDOLIN et al., 2013). Já a convulxina é uma glicoproteína correspondendo à 5% do peso seco do veneno e apresenta massa molar de 68kDA. Esta, induz perda de equilíbrio, alteração gastrointestinal, convulsões e alterações visuais logo após a inoculação do veneno. As alterações hematológicas são caracterizadas por agregação plaquetária com possível isquemia cerebral (CUNHA; MARTINS, 2012).

Por fim, a Crotoxina, que é a proteína de interesse neste estudo, é uma β -neurotoxina, isolada em 1938 por Slotta do veneno da *Crotalus durissus terrificus*. Esta toxina é um oligômero não covalente, formado por duas subunidades: uma ácida e outra básica. A parte básica possui atividade de fosfolipase A2 (PLA2) e é neurotóxica, enquanto a subunidade ácida é enzimaticamente e farmacologicamente inativa, porém, contribui para o aumento da toxicidade da subunidade básica. A subunidade ácida é considerada um auxiliar da sub-unidade básica, pois aumenta sua estabilidade e especificidade.

A crotoxina tem peso molecular de 23.5 KDa, sua sub-unidade básica tem peso molecular de 14.3 KDa e um ponto isoelétrico de 8.9; a sub-unidade ácida possui 9.2 KDa e ponto isoelétrico de 3.8 (RIBEIRO et al., 2012). Ambas as subunidades da crotoxina, se comportam de maneira sinérgica nas membranas sinápticas, sendo que a porção básica permanece ligada a membrana e a porção ácida é liberada. A ligação da porção básica não é específica podendo se ligar á outras membranas, enquanto a porção ácida é específica; ocorrendo a união das duas subunidades, a parte ácida aumenta a sua ação farmacológica com liberação da crotoxina (RIBEIRO et al., 2012).

O efeito letal da crotoxina tem se atribuído ao bloqueio pré-sináptico da transmissão neuromuscular, provocando uma redução da liberação de acetilcolina nos terminais nervosos (BOM et al., 1979). Após estudos com camundongos, Vital Brazil (1966) concluiu que, além do bloqueio pré-sináptico, ocorre também o bloqueio pós-sináptico devido a ligação da crotoxina a sítios específicos com alta afinidade. A ação do bloqueio neuromuscular envolve uma ação trifásica na liberação de acetilcolina; primeiramente, ocorre uma redução inicial rápida no teor de quantidade liberada do neurotransmissor seguido por um aumento secundário e, em seguida, a terceira e última fase, consiste na diminuição lenta e progressiva provocando eventualmente o bloqueio completo. Sua potencialidade e ação dependem do sinergismo entre as duas subunidades PLA2 e crotopotina; a atividade da PLA2 também contribui para efeitos adicionais como miotoxicidade, inflamação e dor (SAMPAIO et al., 2010).

1.3 INTERAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO

1.3.1 ANTÍGENO E ANTICORPO

Anticorpos são glicoproteínas ligadas a membrana funcionando como receptor de células B para os antígenos. Antígeno é qualquer molécula que seja capaz de ligar-se a um anticorpo obtendo assim uma resposta imunológica. (MURO et al 2009). As moléculas de anticorpos são produzidas pelas células e consistem em três porções iguais de tamanho, duas regiões são variáveis e estão envolvidas com o sítio de ligação ao antígeno e a região C é pouco variável e interage com moléculas efectoras e células. Todos os anticorpos são construídos a partir de cadeias polipeptídicas pesadas e leves e são conhecidos também como imunoglobulinas (JANEWAY et al 2001).

Os anticorpos são responsáveis por proteger o hospedeiro contra antígenos através da neutralização ligando-se ao patógeno ou toxinas bloqueando seus efeitos sobre as células; posteriormente este patógeno é fagocitado pelos macrófagos, ou seja, os anticorpos tem a função de neutralizar e eliminar o patógeno que gerou sua produção no organismo (MELO, 2006).

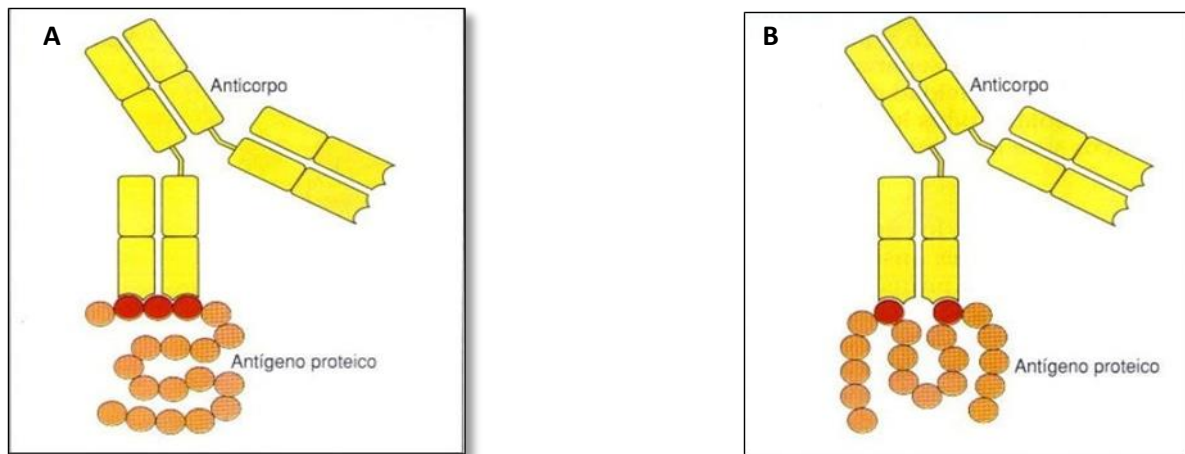
1.3.2 EPÍTOPOS E SEU MAPEAMENTO

A porção de um antígeno de proteína que é reconhecido por uma molécula de anticorpo é designado como determinante antigênico ou epítipo da proteína, sendo capaz de despertar uma resposta imune (Regenmortel, 2001). Os epítopos podem ser classificados em contínuos ou descontínuos; o contínuo ou linear é constituído de um fragmento contínuo da sequência da proteína, já o descontínuo ou conformacional é composto por diversos fragmentos ao longo da sequência e são aproximados na proximidade espacial quando a proteína é enovelada (MACHADO DE ÁVILA, 2011) .

Os epítopos contínuos podem também ser chamados de epítopos lineares (Figura 1A) ou podem ser compostos por uma região na superfície tridimensional da proteína, já os chamados epítopos conformacionais (Figura 1B), consistem em duas ou mais regiões que encontram-se separadas na sequência linear do antígeno na

qual são reconhecidas em conjunto pelo anticorpo. A maior parte da resposta imune mediada por células B, produz anticorpos que reconhecem as proteínas inteiras na sua conformação, uma vez que o antígeno não sofre o processamento complexo pelo qual passam os antígenos apresentados às células T, por isso epítopos conformacionais agem como os principais determinantes da resposta imune humoral (DUARTE, 2007).

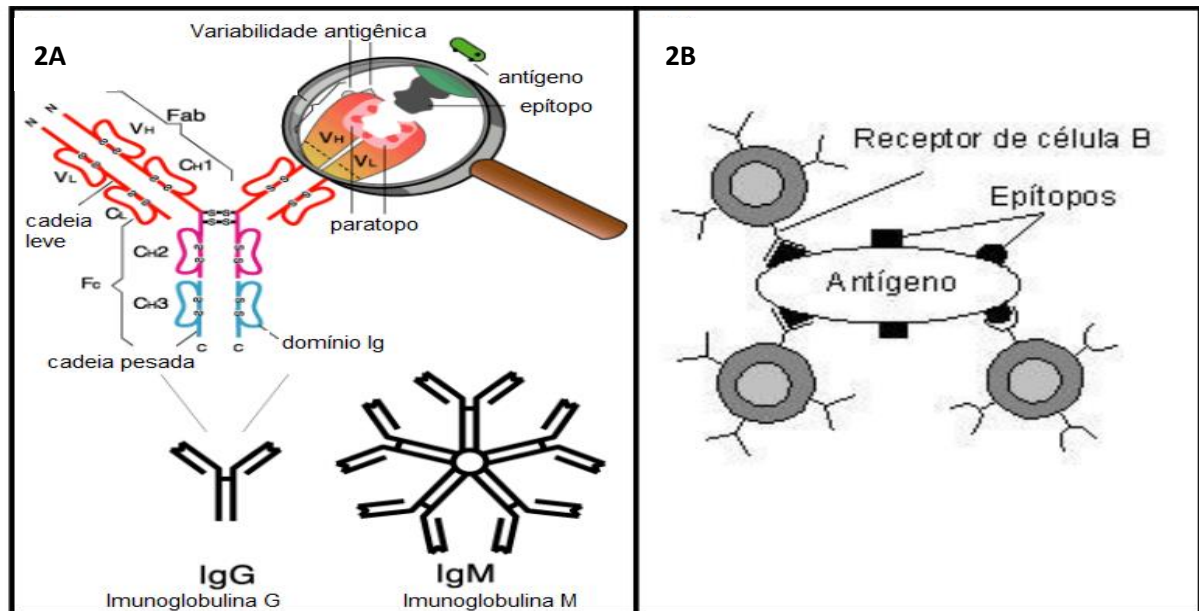
Figura 1 - Representação esquemática dos diferentes tipos de epítopos. Em A: Ilustração de um epítipo linear. Em B: Ilustração de um epítipo conformacional.



Fonte: Adaptado de PARHAM, 2011, p.101.

As interações entre antígeno-anticorpo acontecem somente quando o parátipo do anticorpo se liga ao epítipo de um antígeno (Figura 2A). (MACHADO DE ÁVILA, 2011). Os anticorpos possuem um único tipo de receptor, já os antígenos podem possuir vários epítopos, pois na maioria das vezes, essa estrutura é formada por carboidratos ou proteínas (FIGURA 2B) (PARHAM, 2011, p.100).

Figura 2- Representação esquemática da interação antígeno-anticorpo. Em 1A: Ilustração da interação do epítipo de um antígeno com o paratopo de um anticorpo. Em 1B: Ilustração de um antígeno com vários epítipos distintos



Fonte: adaptado de MACHADO-DE-ÁVILA, 2011.

Com a criação de tecnologias experimentais permitiu-se a identificação de epítipos em uma resposta imune através do chamado mapeamento. (DUARTE, 2007). Os principais métodos para identificação de epítipos são: métodos imunquímicos, cristalografia de raios X e métodos de predição computacional. No entanto, o método mais adequado para encontrar um epítipo é resolver a estrutura 3D do complexo antígeno-anticorpo por cristalografia de Raios-X (MACHADO DE ÁVILA, 2011). Os métodos tradicionais para predição de epítipos são geralmente mais complicados e requerem grandes recursos (NADUGALA, PREMARTNE, GOONASEKARA, 2016).

No entanto, são poucas as técnicas desenvolvidas para a identificação precisa desse tipo de epítipo, dentre as poucas existentes, a maioria é baseada em técnicas computacionais (DUARTE, 2011). Com o advento das tecnologias relacionadas com banco de dados e previsão de uma região epitópica é possível realizar a predição de epítipos de células B. As ferramentas de bioinformática ativam e realizam uma verificação sistemática de epítipos com potencial de antígeno (NADUGALA, PREMARTNE, GOONASEKARA, 2016).

Por serem mais baratas, estas técnicas utilizam apenas um computador e conhecimentos sobre proteínas, para identificar regiões ou epítomos antigênicos necessita-se de algoritmos com diferentes características físico-químicas da proteína alvo (PELLEQUER; WESTHOF, 1993).

1.3.3 BIOINFORMÁTICA

Com a revolução da computação foi possível melhorar e aprimorar ferramentas computacionais nas mais diversas áreas, na saúde, surge a bioinformática. Desta forma, a bioinformática pode ser caracterizada como um estudo da aplicação de técnicas computacionais e matemáticas para o gerenciamento e também geração da bioinformação no âmbito biológico e consequentemente da saúde. Trata-se de uma forma de armazenamento e análise de dados biológicos brutos que permite-se reconhecer sequências de genes; prever a configuração tridimensional de proteínas; identificar inibidores de enzimas; organizar e relacionar informações biológicas; agrupar proteínas homólogas; formular novos fármacos; dentre outros (ARAUJO, 2008).

A principal ferramenta da bioinformática são os bancos de dados, a fim de organizar as informações facilitando assim as consultas, atualizações e deleções de dados. Estes bancos permitem consultar as sequências de ácidos nucleicos (DNA), aminoácidos (proteínas) ou estruturas proteicas, além de expressão gênica e publicações. Dentre os principais bancos de dados primários estão o *Genbank* e o PDB (*Protein Data Bank*) (SANTOS, 2012).

Outra ferramenta da bioinformática é o alinhamento de sequências. O alinhamento de sequências na bioinformática é uma ferramenta básica, pois através dele, pode-se determinar a similaridade entre as macromoléculas biológicas e agrupa-las de como consequências de relações funcionais ou até estruturais entre elas (SANTOS 2012).

Com o avanço da bioinformática e de técnicas físicas de análises, surgiram bancos de dados e análises que fazem um estudo completo das propriedades físico químicas e biológicas destas macromoléculas. Um destes programas é o STING Millennium. Neste programa, existe um módulo chamado *Java Protein Dossier* (JPD) que a partir de uma estrutural tridimensional já conhecida de proteína, obtém-se centenas de parâmetros físico-químicos e biológicos e agrupa

em uma única base dados, obtendo assim uma base de dados completa de descritores sobre a estrutura-função da proteína, além da análise dos diversos parâmetros dela (NESHIC et al 2004).

1.3.4 BIOINFORMÁTICA NA PRODUÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS

Como já relatado, o médico francês Léon Charles Albert Calmette, em 1894 introduziu o primeiro tratamento contra veneno de serpentes através do soro monovalente realizado em cavalos imunizados. Posteriormente, no início do século seguinte, inspirado por Calmette, o brasileiro Vital Brazil (1865-1950), mineiro da Campanha, inovou a produção de soro antiofídico, ao utilizar venenos específicos de serpentes brasileira para produzir soros antiofídicos brasileiros. Este método se mostrou eficaz contra os venenos das serpentes mais comuns da América do Sul quando comparado com soros produzidos na Europa, comprovando que protegia contra venenos específicos (VITAL BRAZIL, 2014).

Apesar destes avanços em relação a produção de antivenenos utilizados para o tratamento de acidentes com animais peçonhentos, o protocolo para produção ainda continua o mesmo: hiperimunização de animais de grande porte com um ou mais venenos de interesse médico. Porém, essa prática decorre alguns problemas como: o animal produtor recebe repetidas injeções do veneno extremamente tóxico, fazendo com o mesmo sofra os efeitos do envenenamento e com isso tenha sua saúde debilitada reduzindo sua expectativa de vida de quarenta para dez anos. Isso, acaba levantando importantes questões bioéticas, pois, muitas vezes os componentes tóxicos dos venenos representam apenas uma pequena parte de sua composição comprometendo assim a geração de anticorpos específico, além do mais, o veneno afeta o sistema imune do animal, prejudicando a resposta e gerando antivenenos com menos efetividade. Todos esses fatores afetam na composição e eficácia do antiveneno prejudicando a saúde do paciente e levando a problemas de hipersensibilidade, doença do soro e administração de altas doses (Duarte, 2007)

Atualmente, vem-se procurando substituir proteínas por peptídeos que tenham a mesma função, pois, os peptídeos apresentam maior facilidade para produção, são mais estáveis, menores e mais flexíveis, além de ser uma técnica mais barata, simples e fácil de ser monitorada. Desta forma, o presente trabalho

pretende prever, desenhar, caracterizar e validar epítomos conformacionais da crotoxina para serem utilizados como moléculas aplicadas a diagnósticos e ao tratamento de acidentes com envenenamento com a cascavel.

Portanto, o objetivo geral do trabalho foi realizar a predição e caracterização de um epítomo conformacional da crotoxina, uma proteína presente no veneno da *Crotalus durissus terrificus*. E os objetivos específicos foram, encontrar através de um banco de dados online a estrutura 3D resolvida da crotoxina; prever um epítomo conformacional utilizando ferramentas de Bioinformática; desenhar um peptídeo utilizando os aminoácidos preditos como epítomo conformacional; sintetizar o peptídeo desenhado utilizando a técnica FMOC-sínteses e validar o peptídeo predito como um epítomo conformacional através do teste sorológico Imunoenzimático (ELISA).

2 METODOLOGIA

2.1. BANCO DE DADOS

A crotoxina é uma proteína purificada e cristalografada por raio-X, por isso, obteve-se informações sobre a estrutura tridimensional no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB).

2.2 PREDIÇÃO DE EPÍTOPO E DESIGNER DO PEPTÍDEO

Após a identificação da estrutura da Crotoxina no PDB, foi utilizado a ferramenta de bioinformática *STING Millennium*, um programa de base de dados que fornece visualização, análise da sequência molecular e da estrutura para os dados depositados no *Protein Data Bank*.(NESHICH et al., 2016). O STING fornece também uma série de parâmetros físicos, químicos e biológicos, tornando-se possível descrever e analisar a estrutura, função, sequência, estabilidade e as interações de uma determinada proteína (MACHADO-DE-ÁVILA, 2011).

Combinações destes parâmetros estão disponíveis na ferramenta *Java Protein Dossier* que é integrada com o *STING Millenium*, onde podem ser exibidos e analisados todos os parâmetros físico-químicos de qualquer estrutura, utilizando alinhamentos estruturais pré-calculados, permitindo a comparação direta dos parâmetros dos aminoácidos correspondentes. Quando coletado um número maior de parâmetros dentro de um mesmo banco de dados, possibilita assim uma melhor utilização das informações disponíveis. No JPD as escolhas dos resíduos podem ser realizadas de acordo com diversos critérios (NESHICH et al., 2016). Depois da seleção de alguns parametros como alta acessibilidade e alta hidrofiliçidade, pode-se encontrar residuos com algum potencial epítopo (MACHADO DE ÁVILA, 2011).

Na última etapa, designer do peptídeo, através da combinação de alguns resíduos determinantes que foram selecionados pelos JPD pode ser feita a ligação destes resíduos com os resíduos espaciais mais próximos e obter uma sequência de aminoácidos (MACHADO DE ÁVILA, 2004).

2.3 SÍNTESE SOLÚVEL DO PEPTÍDEO

O peptídeo selecionado como epítipo foi sintetizado manualmente pelo método de Merrifield (1969) e adaptado por Machado de Ávila (2011) utilizando peptídeo em fase sólida (resina), que utiliza aminoácidos especiais para a realização da síntese *in vitro*. Este método adaptado e protocolado já está padronizado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Esse método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos aminoácidos da porção C-terminal para N-terminal. Esses aminoácidos possuem um grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil-metil-oxicarbonila) e sua cadeia lateral também é protegida para evitar possíveis reações indesejadas. Cada etapa onde foi adicionado um aminoácido ou feita a desproteção de um grupamento protetor, pode ser monitorada através do teste de Kayser para poder identificar as aminas livres.

Após a resina e os aminoácidos devidamente pesados de acordo com o protocolo adaptado, a síntese foi realizada em uma seringa contendo a resina e teve início com a adição de dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Em seguida é adicionado 4-metilpiperidina 25% por 20 minutos para eliminar o grupamento Fmoc da resina, e então são realizadas três lavagens com DMF e uma com Diclorometano (DCM). Faz-se o teste de Kayser para confirmar a desproteção (coloração azul) e dá-se início a etapa de acoplamento. Nessa etapa o primeiro aminoácido a ser acoplado é adicionado juntamente com os ativadores da função carboxila, a Oxyma e o DIPC (Diisopropilcarbodiimida), e são deixados por trinta minutos dentro da seringa. Após a acoplagem, cinco lavagens intercaladas com DMF, Metanol e com DCM foram realizadas e após é iniciada a etapa de desproteção. Nessa etapa o grupamento Fmoc do aminoácido acoplado é removido com a adição de 4-metilpiperidina 25% por 20 minutos e feitas as lavagens com DMF novamente e assim o protocolo de acoplagem do segundo aminoácido é reiniciado. Esse ciclo de acoplagem/desproteção é realizado até que todos os aminoácidos do peptídeo sejam acoplados. Após o último aminoácido ser acoplado, agora sem o grupamento Fmoc dando fim aos ciclos, o peptídeo é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem onde acontece a eliminação dos grupamentos protetores da cadeia lateral. Para isso o peptídeo é incubado por 3 horas com uma solução de

clivagem contendo 2,5% de TES (Triethylsilane), 2,5% de água destilada e 95% de TFA (Ácido Trifluoracético). Após esse período filtrou-se o conteúdo recolhendo a solução em um tubo falcon e adiciona-se 15 mL de éter etílico refrigerado para precipitar o peptídeo (emulsão esbranquiçada). O peptídeo é então separado do éter por centrifugação durante 10 minutos em 4°C a 10000 rpm. Após a síntese, o peptídeo foi liofilizado e utilizado para realização do teste de ELISA.

2.4 TESTE SOROLÓGICO - ELISA

Para testar a produção de anticorpos e assim confirmar se o peptídeo é um epitopo, foi utilizado o teste sorológico - ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay), que baseia-se na reação antígeno-anticorpo e será realizado conforme Chávez-Olortegui et al (2001). Uma placa contendo 96 poços foi sensibilizado com 4µL de veneno *C. durissus terrificus* e com 80µL do peptídeo sintético ambos diluídos em tampão de incubação (Bicarbonato de sódio com pH de 9,6 em 100µL/well) á 4 graus Celsius e deixado overnight. Em seguida, após lavagem com solução TBS-Tween e bloqueio da placa com caseína 2%, utilizou-se o soro anticrotático disponibilizado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) na diluição de 1:10.000 em solução de tampão de incubação e realizado diluição seriada iniciando com 1:50. Por último utilizou-se como anticorpo secundário o anti-horse peroxidase com diluição de 1:6000 em tampão de incubação. Para revelação utilizou-se o substrato OPD (ortofenildiamina) e peróxido de hidrogênio. Os valores das absorbâncias foram determinados a 492nm com a utilização do leitor de ELISA. Todas as medidas foram realizadas em duplicatas e os resultados foram expressos com a média dos valores, sendo realizadas análises dos testes de avaliação dos anticorpos obtidos em estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Venenos são misturas altamente complexas de muitas proteínas diferentes, que exercem efeitos tóxicos relevantes que podendo ser neutralizados por anticorpos específicos. Em casos de envenenamento os processos fisiopatológicos são complexos envolvendo ação simultânea de diversas toxinas. Devido a isso, torna-se essencial o desenvolvimento de testes e análise destas proteínas tóxicas para compreensão dos mecanismos e funcionamento, assim como a produção de soro com poder neutralizante (Machado de Ávila et al 2015).

A análise e abordagem metodológica aplicada para facilitar a avaliação de venenos é denominada de Antivenômica, esta permite a classificação de toxinas em: toxinas C (completamente imunodeprimidas por um soro), toxinas P (parcialmente imunodeprimidas por um soro) e N-toxinas (não imunodeprimidas por um soro) (GUTIERREZ, LEÓN, BUMOUF, 2011).

Soros terapêuticos preparados a partir de plasmas de cavalos hiperimunizados são considerados o único tratamento específico para envenenamento por serpentes no Brasil (BRASIL, 2015). Desde a descoberta do primeiro antiveneno por Calmette em 1894, a produção não teve grandes evoluções e o princípio básico ainda continua o mesmo: injeções com o veneno bruto, sendo que o animal de escolha ainda permanece o cavalo, devido a grande quantidade de sangue que pode ser obtida, fácil manuseio e criação em áreas tropicais (CHIPPAUX, 2013).

No entanto, a imunização destes animais com o veneno bruto, exerce efeitos tóxicos extremamente nocivos desencadeando um complexo de sintomas clínicos devido à perturbação dos sistemas neuromuscular, cardiovascular e respiratório, ocasionando a morte precoce do animal e reduzindo drasticamente o número de animais úteis para a produção de soros (MACHADO DE ÁVILA et al, 2004)

Quando a toxina letal principal componente do veneno é identificada, a capacidade de um antídoto reagir ou neutralizar sua ação no organismo é relativamente grande, sendo que, o principal exemplo disso é a crotovina. Ela é

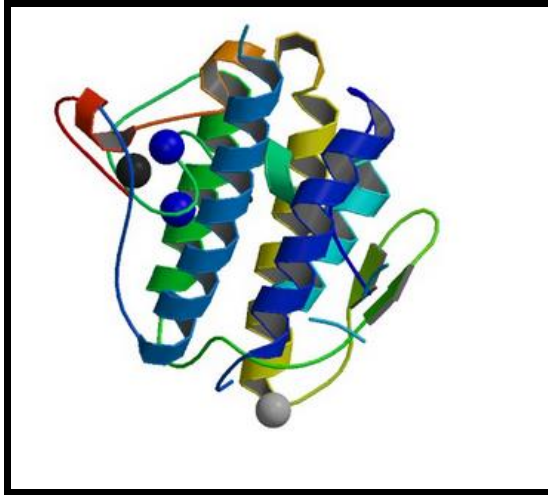
responsável pelas três manifestações mais importantes causadas pelo envenenamento por *C.d. terrificus*: a neurotoxicidade, miotoxicidade e insuficiência renal aguda. Porém, a letalidade de muitos venenos depende do sinergismo e ação em conjunto de toxinas como metaloproteases, PA2, serina proteinases entre outras, dificultando os ensaios de letalidade e realização de testes imunológicos. (GUTIERREZ, LEÓN, BUMOUF, 2011).

No sorodiagnóstico para o envenenamento pela *C.d terrificus* apenas $10 \pm 20\%$ da resposta imune é ativada contra as proteínas do veneno utilizadas na imunização. Estes anticorpos heterólogos são, por conseguinte, imunógenos pouco eficazes e podem ser responsáveis pelos efeitos adversos (DEMANGEL et al 2000). Por isto, a identificação de antígenos com potenciais epítomos, são combinações necessárias para análise de uma resposta imunitária eficaz, contra as proteínas tóxicas mais importante em um veneno (GUTIERREZ, LEÓN, BUMOUF, 2011).

Neste sentido, o principal objetivo da identificação de um epítomo é desenhar uma molécula que seja capaz de substituir um antígeno no processo de produção de anticorpos e que possa ser sintetizado. Os primeiros estudos feitos para entender e prever epítomos de células B foram baseados nas propriedades dos aminoácidos como flexibilidade, hidrofiliçidade, antigenicidade e acessibilidade (KOZLOVA et. al 2015). Com o auxílio de ferramentas de bioinformática torna-se possível a identificação e o desenvolvimento de uma proteína peptídica com potencial epítomo da crotoxina e com os efeitos de PA2, capaz de induzir efeito neutralizante do veneno.

A crotoxina é o principal componente tóxico do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (60-65% peso bruto do veneno) isolado em 1938 e foi a primeira proteína de veneno a ser cristalizada e cristalografada em raio-X (SANTOS, 2014), sendo assim, esta toxina que foi o foco do nosso estudo, possui uma estrutura tridimensional (figura 3) cadastrada no PDB, com código de identificação 3R0L e com resolução de 1.35Å. A crotoxina possui 2 subunidades, uma ácida e uma base, formadas por quatro cadeias polipeptídicas (cadeias: A, B, C e D). Neste estudo, a sequência de aminoácidos de escolha foi a da cadeia D, por possuir função de PLA2, responsável pelo efeito toxico da toxina. A sequência desta cadeia está ilustrada na figura 3.

Figura 3 – Estrutura tridimensional da Crotoxina (PDB: 3R0L e resolução de 1.35Å)



FONTE: PDB(<http://www.rcsb.org/pdb/files/fasta.txt?structureIdList=3R0L>)

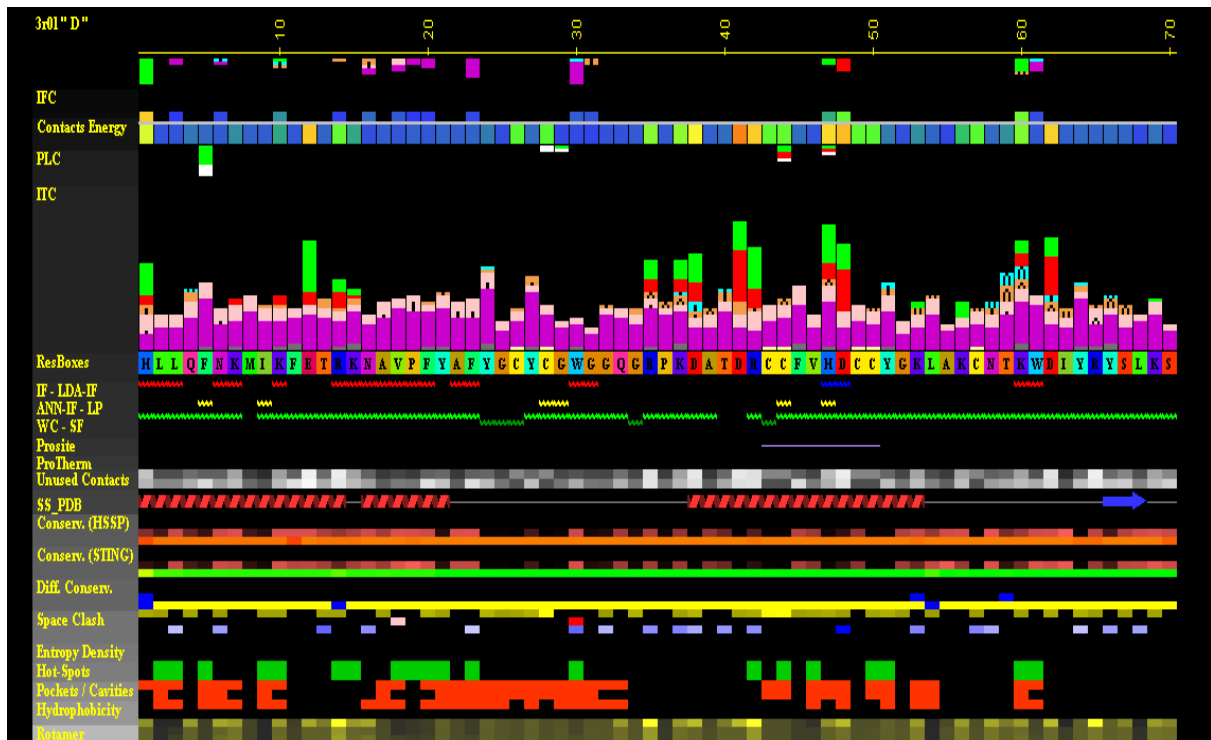
Figura 4 - Sequência de 122 aminoácidos da crotoxina, cadeia D, identificados no PDB de código 3R0L.

```
3R0L : D: HLLQFNKMIKFETRKNVFPFYAFYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGKLAKCNTKWDIYR
YSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAECLRRSLSTYKNGYMFYPDSRCRGPSETC
```

FONTE: PDB(<http://www.rcsb.org/pdb/files/fasta.txt?structureIdList=3R0L>)

Após a identificação da estrutura 3D no PDB e de posse do modelo tridimensional, utilizou-se o STING Millennium para calcular as propriedades físico-química e biológicas desta toxina. O programa calculou e retornou todos os dados em um arquivo de formato TGZ. De posse deste arquivo, utilizou-se um módulo do *STING Millennium*, o JPD, onde é possível visualizar em uma única janela mais de 700 parâmetros físicos, biológicos e químicos para cada aminoácido. Cada cor como demonstrado na figura 5, contém as informações para um determinado aminoácido. São informações como hidrofobicidade, acessibilidade, números de contato, energia, entre outros.

Figura 5 – Figura ilustrativa da visualização dos parâmetros de cada aminoácido em uma estrutura primária de um proteína.



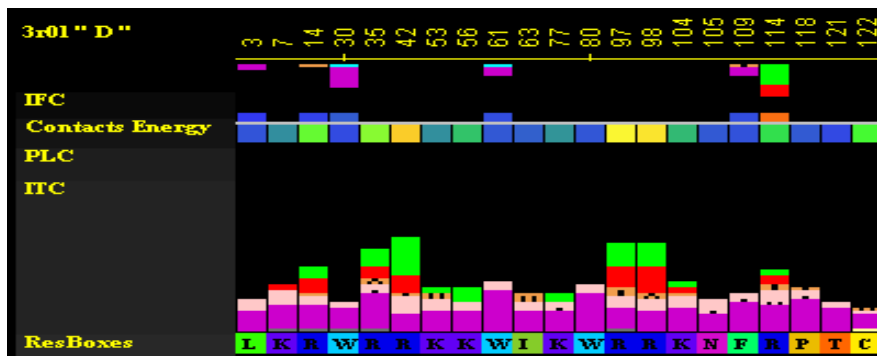
Fonte: JDP (JAVA PROTEIN DOSSIER – 3R0L)

De acordo com Machado de Ávila, 2011, os parâmetros selecionados a partir de características determinadas importantes para determinação de um epítopos são a alta Acessibilidade e serem Hidrofílicos . Os epítopos são regiões das proteínas que se encontram na superfície da mesma e fazem contato com uma outra proteína, os anticorpos. Deste modo, estes parâmetros são características de aminoácidos que fazem parte de um epítopo.

Assim, neste trabalho, após identificar o aminoácido mais acessível (que possuía um valor de 220\AA^2), selecionou-se dentro do JPD os aminoácidos da cadeia D da crotoxina que possuíam a metade ou mais deste valor, ou seja, aqueles tinham um valor de acessibilidade acima de 110\AA^2 . Estes resíduos de aminoácidos selecionados, continham um potencial para fazer parte de um epítopo e assim faziam parte dos aminoácidos antigênicos da crotoxina. Os aminoácidos encontrados neste estudo são: L3, K7, R14, W30, R35, R42, K53, K56, W61, I63,

K77, W80, R97, R98, K104, N105, F109, R114, P118, T121, C122 como mostra a figura 6.

Figura 6 – Aminoácidos mais acessíveis da cadeia de D da crotoxina fornecidos pelo *Sting Millenium*.



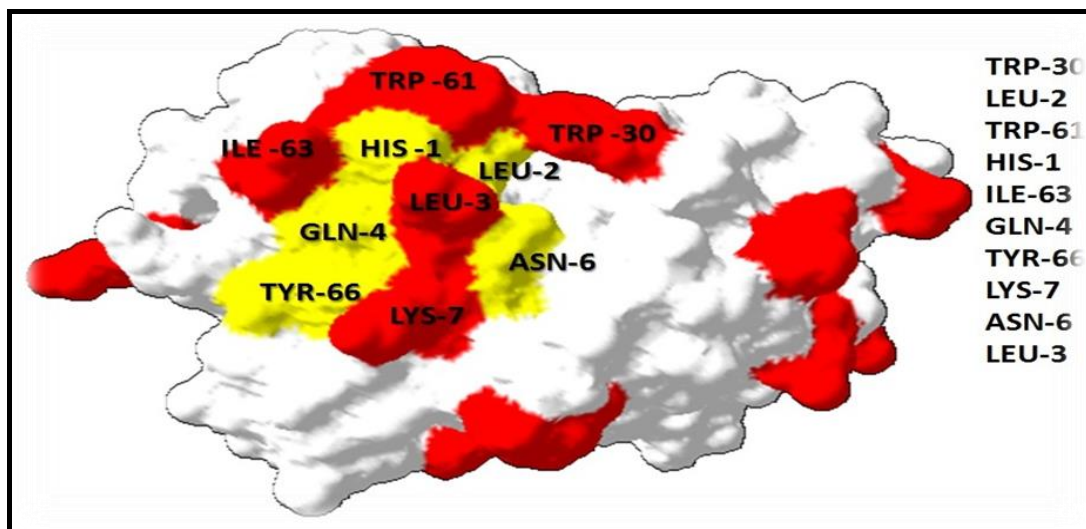
Fonte: *Sting Millenium*

Os aminoácidos encontrados no JPD com maior acessibilidade foram manualmente desenhados na ferramenta de visualização de proteínas, o *SwissPDBViewer* como demonstrado na figura 7. Os aminoácidos com coloração vermelha são os que possuem maior acessibilidade e considerado um maior potencial epítipo; os com coloração amarela foram selecionados como aminoácidos de ligação para dar a forma de epítipo conformacional. Desta forma, o peptídeo que mimetiza a região epitópica da crotoxina possui a seguinte sequência: WLWHIQYKNL (Triptofano-30, Leucina-2, Triptofano-61, Histidina-1, Isoleucina-63, Glutamina-4, Tirosina-66, Lisina-7, Asparagina-6, Leucina-3). A representação da região epitópica na estrutura 3D comprovou sua exposição na superfície da molécula, sendo portanto, uma região conformacional, ou seja um epítipo conformacional e acessível por anticorpos.

Devido ao fato do uso de ferramentas de bioinformática para o desenvolvimento de uma proteína peptídica ser uma área recente de pesquisa, não foram encontrados trabalhos na literatura à cerca das sequências de resíduos de aminoácidos da crotoxina utilizando bioinformática; porém CHOUMET C. et al (1999) e DEMANGEL C. et al (2000) utilizando a técnica de *Phage display* identificaram os resíduos que compõe um epítipo funcional da crotoxina através da sua interação com um anticorpo monoclonal IgG mAbA-56.36. Os resultados obtidos

neste estudo foram que o mAb A-56.36 neutralizou e reagiu com a subunidade básica da crotoxina, bloqueando a sua ação enzimática, ou seja, fosfolipásica. Como os efeitos letais da crotoxina dependem da interação das duas subunidades (A e B), bloqueando uma, não existe interação com a outra e conseqüentemente os efeitos letais da crotoxina não acontecem. Assim, em nosso trabalho, se o peptídeo proposto também for capaz de induzir anticorpos que se liguem a crotoxina, ele poderá neutralizar essa subunidade e conseqüentemente a toxina.

Figura 7 – Epítipo conformacional predito da crotoxina. Em vermelho os resíduos de aminoácidos selecionados pelo programa *Sting Millennium* e em amarelo estão os resíduos de aminoácidos utilizados para a ligação dos resíduos e desenho do peptídeo.



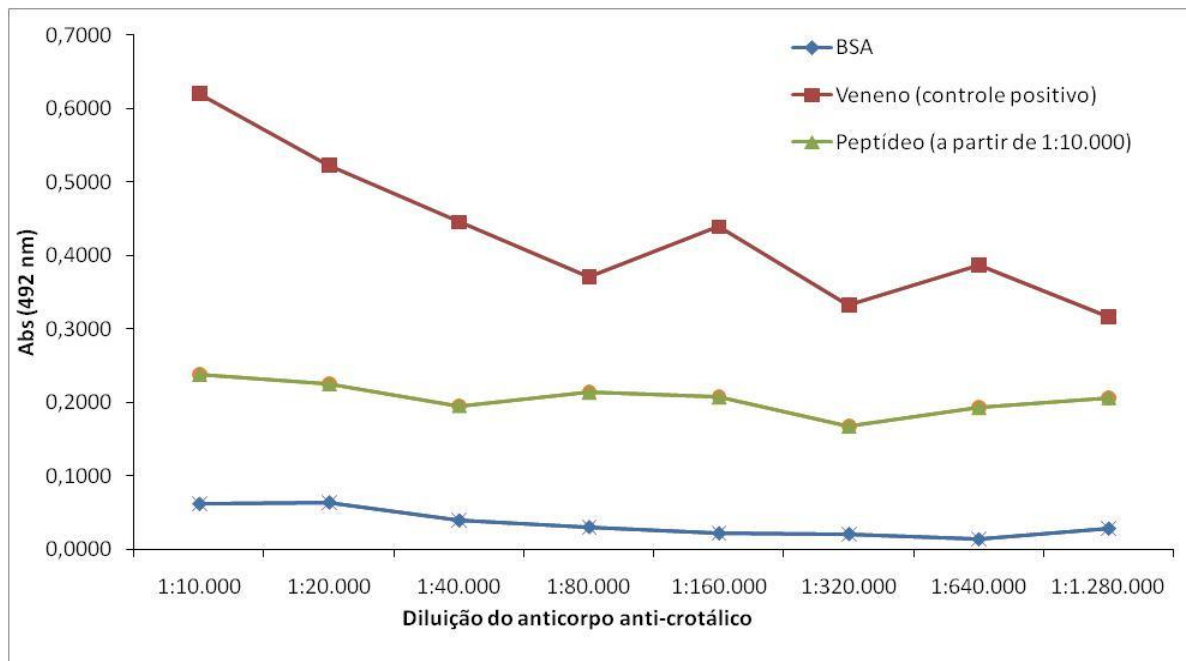
Fonte: SPDV

A identificação de proteínas imunogênicas e seus epítios, conduzem à utilização de substâncias mais propícias à serem utilizadas como imunógenos para o desenvolvimento de antivenenos eficazes, puros e com maior poder de neutralização (MARIA et al, 2005). Por isso, através deste estudo, ao identificar um epítipo específico da principal toxina do veneno crotálico, é possível permitir uma melhor qualidade e a eficácia na produção de soros contra este veneno, pois com a substituição do veneno que é extremamente tóxico por peptídeos, evita-se que seja produzido anticorpos contra todas as moléculas presente no veneno diminuindo a ineficácia do soro e possíveis reações cruzadas (KOZLOVA et. al 2015).

Assim para verificar se o peptídeo proposto por bioinformática, poderia ser utilizado na produção de um antígeno capaz de neutralizar a ação do veneno, primeiramente ele foi sintetizado através da síntese química do peptídeo pela técnica Fmoc-Síntese conforme descrito por Merrifield, 1969 e adaptada por Machado de Ávila et. al. 2011. Cada aminoácido foi adicionado após desproteção do grupamento protetor do aminoácido anterior e as ligações ocorreram corretamente após verificação do teste de Kayser (VOGEL). O peptídeo sintetizado foi então submetido como antígeno no Teste de ELISA. O teste de ELISA foi realizado para análise da reatividade do peptídeo frente o soro comercial produzido pela FUNED, a partir de imunizações em cavalo e utilizando o veneno bruto como imunogêno. Assim, na figura 8 pode-se observar que o resultado da titulação em diferentes diluições foi satisfatório; o veneno como já era esperado ligou-se fortemente ao soro e o peptídeo apesar de não ligar tão fortemente como o veneno apresentou certa reatividade, bem diferente do BSA (controle negativo) que não se ligou ao soro comercial.

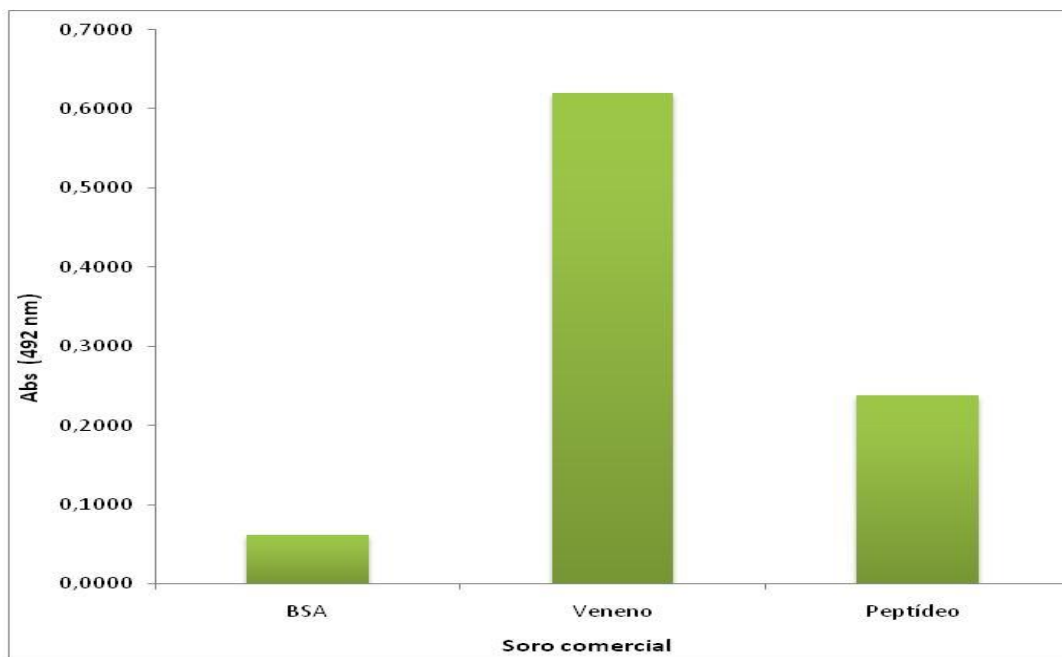
Na figura 9, vimos apenas o primeiro ponto da titulação apresentada na figura 8, mostrando mais claramente que quando comparado ao controle negativo (BSA), tanto o peptídeo quanto o veneno tiveram reatividade frente ao soro comercial produzido pela FUNED, confirmando assim que o peptídeo predito mostrou-se eficaz ligando-se aos anticorpos do soro. Com esse resultado é provável que induza a produção de anticorpos anti-peptídeo podendo também vir a ser utilizado na fabricação de soro diagnóstico.

Figura 8 – ELISA indireta da titulação do peptídeo da crotoxina frente ao antiveneno (anticrotálico) produzido pela FUNED.



Fonte: Próprio autor.

Figura 9 – Comparação da reatividade entre controle negativo, peptídeo e veneno frente o soro anti-crotálico.



Fonte: Próprio autor.

Diversos estudos foram realizados em outras espécies utilizando a predição de epítomos e que também mostraram resultados satisfatórios quando utilizado como imunógenos e antígenos. Maria et al., (2005) descreveu que utilizando peptídeos proveniente de três toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TsII, TsVII, TsIV) demonstrou que a produção de anticorpos anti-peptídeo em eqüinos neutralizaram os efeitos do veneno do escorpião devido o reconhecimento das regiões N e C-terminal das toxinas pelo peptídeo; Machado de Avila et al., (2014) também descreveu que utilizando epitopo do veneno da serpente *Lachesis muta muta* que foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra o fator hemorrágico que o envenenamento provoca.

4 CONCLUSÃO

A predição, caracterização e síntese do peptídeo da crotoxina juntamente com os resultados do teste sorológico mostrou-se eficiente, confirmando a propriedade imunogênica do peptídeo, tornando-se uma alternativa promissora na produção de um antiveneno capaz de neutralizar o efeito tóxico do veneno total ou nos diagnósticos para acidentes com o escorpião *T. serrulatus*..

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.S. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**. v. 10(4), p. 0121427, 2015
- BARROS, G.A.C et al, In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania(L.) Infantum Chagasi*. **Journal of venomous animals and toxins including tropical disease**. v. 21, p. 48, 2015.
- BOM, C. et al. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **European Journal of Biochemistry**. v. 99(3), p. 471-81, 1979.
- BRASIL. Ministério da Saúde, 2015. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> Acesso em 02 de abril de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília, 2001. 14 p. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu_peco01.pdf>. Acesso em 02 de abril de 2016.
- BASTOS, E.G.M. et al. Records of the rattle snake *Crotalus durissus terrificus* in the state of Rio de Janeiro: a possible case of invasion facilitated by deforestation. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 22, n. 3, p. 812-815, 2005.
- CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.6, p. 338-338, 2003.
- CHIPPAUX, J P.Place. l'immunothérapie dans le traitement actuel des envenimations ophidiennes. **Natle Medicine**.v.197,n.2, p.993-1008, 2013.
- CHOUMET V, et al. Molecular Mimicry between a Monoclonal Antibody and One Subunit of Crotoxin, a Heterodimeric Phospholipase A2 Neurotoxin. **Biol.Chem**. V.380, p.561-568, 1999.
- COSTA, M.I.E. et al . Structural and evolutionary insights into endogenous alpha-phospholipase A2 inhibitors of Latin American pit vipers. **Toxicon**. v.112, p. 35-44, 2016.

CUNHA, E.M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras do Genero Botrops e Crotalus: Uma revisão . **Revista Eletronica de Educação e Ciencias**. v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

DE GROOT, A.S. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. **Drug Discovery Today**. v. 11, n. 5-6, p. 203-9, 2006.

DEMAGEL C, et al. Combining phage display and molecular modeling to map the epitope of a neutralizing antitoxin antibody. **Biochem**. v.267, p.2345-2353, 2000.

DUARTE, Clara Guerra. **Identificação, síntese e caracterização de um epitopo descontínuo da tsntxp: uma anatoxina natural do veneno do escorpião Tityus serrulatus**. 2007. 87f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1988.

FAVORETTO, B.C. et al. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**. v. 57, n. 4, p. 600-7, 2010.

FEITOSA, R.F.G. et al. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas do estado do Ceará-Brasil. **Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical**. v.30, n.4, p.295-301, 1997.

FUSCO, L. S. et al. New immunization protocol to produce crotalic antivenom combining *Crotalus durissus terrificus* venom and its PLA2. **Toxicon**.v43 , p.62-70, 2014.

GONZAGA et al. Relação antígeno anticorpo.FAMED. **Revista eletrônica de medicina veterinária**. n.12, 2009.

GRACIANO, S.A. et al; Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos em homens. **Revista de Enfermagem**, v.3, n.10, p.89-98, 2013.

GUIDOLIN F.R. et al. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**. v. 66, p. 7-17, 2013.

GUTIERREZ, J.M. ,LEON G., BUORNOUF T Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings. **ELSIEVER**. v39 , p.129-142, 2011

JANEWAY et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. 2001.

JUNIOR, B.F. et al. Snake venom sand antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on Snakebite management. **Journal of Proteomics**. v.73, n. 9, p.1758-76, 2010.

KOZLOVA, E.E.G., et al. Classification epitopes in groups based on their protein Family. **BMC Bioinformatics**. 2015.

LAGO, L.A. et al. Perfil bioquímico sorológico de bovinos inoculados experimentalmente com veneno crotalítico iodado livre e iodado em lipossomas, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n.5, p.653-657, 2004.

LOMEO, R.S. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. **Toxicon**.v. 85, p. 5-16, 2014.

MARIA, W. S et al. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. **Toxicon**. v.46, p.210-217. 2005

MACHADO DE ÁVILA, Ricardo Andrez. **Predição de epítomos descontínuos ou conformacionais em proteínas através da bioinformática estrutural**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MACHADO DE ÁVILA, Ricardo Andrez. **Predição De Epítomos Conformacionais Aplicada a Biotecnologia Peptídica no desenvolvimento de Imunobiológicos**. 2014. 27f. Edital Universal – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2014.

MACHADO DE ÁVILA, et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon**. v. 44, n. 3, p. 233-241, 2004.

MARCUSSI, S. et al. .Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation**. v.724, n.1-2, p. 59-63. 2011.

NADUGALA, et al Systematic Bioinformatic Approach for Prediction of Linear B-Cell Epitopes. **Advances in Bioinformatics**. v 33, n. 15, p 789-8, 2014.

PARHAM, Peter. **O sistema Imune**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PARDAL, P.P.O. et al. Snake bite by the rattle snake (*Crotalus SP.*) in Ponta de Pedra – A Case report. **Revista Paraense de Medicina**. v. 21, n.3, p.69-73, 2007.

PELLEQUER, J.L; WESTHOF, E. Preditop: A program for antigenicity prediction. **Journal of Molecular Graphics**. v. 11, n. 3, p. 202-210, 1993.

REGEMORTELF, M.H.V. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. **Biologicals**. v. 29, n.3-4, p. 209-13. 2001.

RIBEIRO, G.B. et al. Study of crotoxin on the induction of paralysis in extraocular muscle in animal model. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 75, n.5, p.307-312, 2012.

RODRIGUEZ, J.P. et al. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. **Medicina B Aires**. v.66, n.6, p. 512-6, 2006.

SAMPAIO, S.C et al. Crotoxin: Novel activities for a classic b-neurotoxin. **Toxicon**. v. 55, n. 6, p.1045-60, 2010.

SANTOS A.R. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**. v. 44, n. 6, p. 609-16, 2004.

SANTOS, M.,C. Crotoxina e crotoxina - simile isoladas de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* e suas múltiplas atividades biológicas. **Scientia Amazonia**. v. 3, n.1, p. 102-115, 2014.

SCHWEDE, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology modeling server. **Nucleic Acids Research**. v. 31, n. 13, p.3381-5, 2003.