



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co NA ESTRUTURA
MOLECULAR DA BOTHROPSTOXINA-1**

PATRICK JACK SPENCER

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Dr. José Roberto Rogero

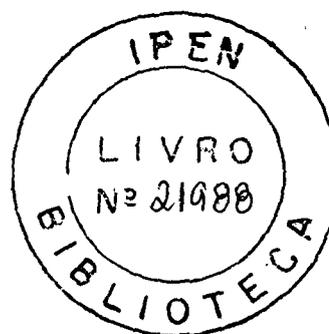
**São Paulo
2000**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co NA ESTRUTURA MOLECULAR
DA BOTHROPSTOXINA-1

PATRICK JACK SPENCER



Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
2000

Ao meu avô, Kurt Schoeninger, *in memoriam*, por ter despertado em mim a curiosidade pelas coisas da natureza e a meus pais por me permitirem chegar até aqui.

Agradecimentos

Ao Dr. José Roberto Rogero, orientador deste trabalho, pelo apoio incondicional, incentivo, ensinamentos e sobretudo pela oportunidade de trabalhar com ele.

Ao Dr. Cláudio Rodrigues, superintendente do IPEN, pela oportunidade de trabalhar neste instituto.

Ao Dr. Leonard A. Smith pelo convite para trabalhar em seu grupo.

A amiga Nanci ("chefinha"), colaboradora de longa data e amiga pelo carinho e por tornar o que outros chamariam de trabalho uma divertida brincadeira.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. Por seu apoio, dicas e conselhos

A Dra Judith Kloetzel por ter me iniciado na carreira científica.

A Carol pelo apoio, incentivo, carinho e paciência.

Aos amigos Mônica e Chico pelo apoio em todas as etapas deste trabalho.

Ao amigo Johnny, companheiro de experimentos, congressos e eventos em geral.

Ao Coronel Parker por ter me aberto as portas de USAMRIID.

Ao Tenente Coronel Ross Leclair por facilitar a minha ida para Frederick.

Ao Dr. Robert Webb por tornar minha estada no exterior muito mais divertida e por me ensinar muito.

Ao Capitão Doutor (ou Doutor Capitão, eu sei lá) Michael Byrne, por me emprestar seus fluorímetros, CDs e outros brinquedos e pela paciência em tentar ensinar físico-química para um biólogo.

Ao Dr. Bradley Stiles por incentivar todo e qualquer experimento envolvendo fosfolípases.

Ao Dr. Ivan Kaiser por seus ensinamentos fosfolipásicos.

Ao Sargento Michael Dancer e aos soldados Marco Carrington e Charlene Beard pelo apoio técnico sem o qual este trabalho não teria sido possível.

A amiga Bonnie Loveless, companheira de experimentos e pescarias pela amizade e dedicação.

A Theresa Smith, pela hospitalidade e pelo tempo que dedicou aos ensaios no Biacore.

As amigas Malvina e Helena pela amizade e ajuda em muitas etapas deste trabalho.

Ao Dr. John Carra pela ajuda “termodinâmica”.

Aos amigos Ernie e Harry por sempre dar um jeito de colocar minhas amostras na frente da fila.

Aos amigos André e Cecília pela ajuda preciosa no início deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

EFFECTS OF RADIATION ON THE STRUCTURE OF BOTHROPSTOXIN-1
Patrick Jack Spencer
ABSTRACT

Ionizing radiation has been widely employed to attenuate venoms and toxins, preserving and even enhancing their immunogenic properties. However, little is known about the molecular changes that irradiated proteins undergo. In the present work, we compared native and irradiated bothropstoxin-1, aiming to characterize the structural modifications that radiation induces. Our results indicate that radiation promotes a transition from the multimeric to the monomeric state in a dose-dependent manner. Spectral and calorimetric analysis suggest that the irradiated molecules suffer oxidation and unfold partially, the remaining structural elements being stabilized by the seven disulphide bonds. The binding pattern of monoclonal antibodies raised against irradiated bothropstoxin indicates that most of the recognized epitopes are linear and present at the surface of both the native and the irradiated toxin. Furthermore, the irradiated toxin appears to be more immunogenic, inducing the formation of native toxin-binding antibodies.

EFEITOS DA RADIAÇÃO NA ESTRUTURA DA BOTHROPSTOXINA-1
Patrick Jack Spencer
RESUMO

A Radiação ionizante tem sido utilizada com sucesso para atenuar venenos e toxinas, preservando e até mesmo aumentando a sua imunogenicidade. Entretanto, pouco se sabe a respeito a respeito das alterações moleculares sofridas por toxinas irradiadas. No presente trabalho, comparamos bothropstoxina-1 nativa e irradiada com o intuito de caracterizar as modificações estruturais que a radiação acarreta. Os Nossos resultados indicam que a radiação causa uma transição da bothropstoxina do estado multimérico para o monomérico com um padrão dose-dependente. Análises espectrais e calorimétricas sugerem que a toxina irradiada sofre oxidação e alterações parciais de estrutura secundária e terciária e que os elementos estruturais remanescentes estão estabilizados pelas sete pontes dissulfeto. O padrão de ligação de anticorpos monoclonais produzidos contra a toxina irradiada indicam que a maioria dos epitopos reconhecidos são lineares e estão localizados na superfície da toxina nativa e irradiada. A toxina irradiada se comportou como um melhor imunógeno, levando à formação de anticorpos capazes de reconhecer a toxina nativa.

Sumário

	Página
1-Introdução.....	1
2 Objetivos.....	18
3 Material e métodos:.....	19
3.1 Purificação da bothropstoxina-1:.....	19
3.2 Dosagem de proteínas:.....	19
3.3 Determinação da pureza:.....	19
3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):.....	20
3.3.2 Seqüenciamento N-terminal:.....	20
3.4 Irradiação das amostras:.....	20
3.5 Análise das alterações estruturais:.....	21
3.5.1 Espectrometria de massa.....	21
3.5.2 Determinação da massa da bothropstoxina-1:.....	21
3.5.3 Espectrometria de massa por desorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF):.....	22
3.5.4 Dicroísmo circular:.....	23
3.5.5 Desnaturação térmica.....	24
3.5.6 Recromatografia da toxina irradiada.....	25
3.5.7 Fluorescência.....	25
3.5.8 Supressão da Fluorescência.....	26
3.6 Análise computacional e modelagem molecular:.....	26
3.7 Produção de anticorpos monoclonais:.....	27
3.7.1 Imunização:.....	27
3.7.2 Fusão.....	28
3.7.3 Screening dos clones.....	30

3.7.4	Análise dos clones positivos por ressonância plasmônica de superfície	31
3.7.5	Subclonagem dos clones de interesse	33
3.8	Caracterização dos anticorpos monoclonais:.....	34
3.8.1	Isotipagem.....	34
3.8.2	Western blot:	34
3.8.3	Determinação da afinidade dos anticorpos:.....	35
4.	Resultados	36
4.1	Purificação da bothropstoxina-1:	36
4.2	Determinação da pureza:	37
4.2.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):	37
4.2.2	Seqüenciamento N-terminal:.....	37
4.3	Irradiação das amostras.....	38
4.4	Análise das alterações estruturais:	38
4.4.1	Espectrometria de massa	38
4.4.1.1	LC/ESI-MS	38
4.4.1.2	MALDI-TOF	41
4.4.2	Dicroísmo circular	45
4.4.3	Denaturação térmica.....	50
4.4.4	Recromatografia da toxina irradiada	52
4.4.5	Fluorescência	53
4.5	Produção de anticorpos monoclonais.....	57
4.5.1	Análise dos clones positivos por ressonância plasmônica de superfície.....	58
4.5.2	Isotipagem.....	62
4.5.3	Western Blot	64
4.5.4	Determinação da afinidade dos anticorpos.....	65
5	Discussão	68
6	Conclusões	78
7.	Referências bibliográficas.....	79

1-Introdução

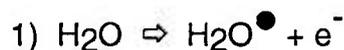
Os acidentes ofídicos representam um problema relevante em nosso país sendo anualmente registrados 20000 casos ³⁵. A soroterapia é o único método de eficácia comprovada no tratamento dos acidentados, desde que administrada em tempo, dose e via adequada ¹⁶. A obtenção de antissoros ofídicos se dá através da imunização de cavalos que são fortemente agredidos pela alta toxicidade dos venenos inoculados. Em vista disto, vários trabalhos vem sendo realizados com toxinas objetivando-se obter imunógenos menos tóxicos, preservando suas propriedades antigênicas e imunogênicas. Dentre as metodologias testadas, podemos citar a irradiação com luz ultravioleta ⁶⁷, a incubação com formaldeído ¹⁵, glutaraldeído ²⁷ ou carboximetil-celulose ⁴³, a adsorção com tanino ⁵², a inativação térmica ⁵⁷, o uso de inibidores de sítio ativo ³², iodação ³¹ e a irradiação . Esta última apresenta a vantagem de não requerer a adição de nenhuma substância ao veneno e têm se mostrado uma ótima ferramenta na detoxicação de venenos e toxinas ^{1, 8, 47, 48, 49, 50, 62}.

A passagem de uma partícula ou fóton pela eletrosfera de um átomo pode provocar excitação ou ionização deste, dependendo da energia transferida. Na excitação, um elétron do átomo adquire energia do fóton, passando para um nível quântico superior, permanecendo em órbita ao redor do núcleo. Na ionização, a energia adquirida pelo elétron é suficiente para que ele seja projetado da eletrosfera, ionizando o átomo ⁵. Como resultado desta ionização, o átomo passa a ter um elétron desemparelhado em um de seus orbitais superiores, tornando-se altamente reativo.

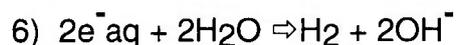
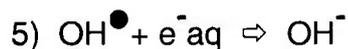
O radical livre assim formado, tem meia vida curta e, em picossegundos, combina seu elétron desemparelhado com um elétron de outro átomo, ejeta seu elétron ou ainda, captura um elétron de outro átomo. Cada uma destas interações pode gerar íons ou radicais livres adicionais e a maioria dos efeitos da radiação em moléculas orgânicas em solução decorre da interação destas com radicais livres provenientes da radiólise do solvente ⁵.

A água é a molécula mais abundante em sistemas biológicos; logo, se quisermos investigar os efeitos da radiação ionizante nestes sistemas, teremos de considerar os efeitos desta radiação na molécula de água.

A irradiação da água pura ou de soluções diluídas gera espécies moleculares e radicais livres conforme as equações abaixo:



A seguir, estas espécies podem reagir entre si segundo as equações abaixo:



A irradiação de proteínas em solução aquosa causa mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e nas estruturas primárias, secundárias e terciárias das moléculas protéicas.

Estas mudanças envolvem perda de atividade biológica e possíveis alterações em suas propriedades imunológicas³⁷. A inativação das moléculas protéicas decorrente da irradiação em solução ocorre como consequência de dois eventos:

Quando a ionização se dá na molécula do solvente, ocorre formação de radicais livres que por sua vez irão interagir com moléculas do soluto configurando o que se denomina efeito indireto. Por outro lado, se a molécula do soluto sofrer diretamente a ação da radiação, falar-se-á em efeito direto. A proporção relativa dos dois efeitos depende da concentração do soluto e, de modo geral, em soluções de baixa concentração, ocorre um predomínio do efeito indireto⁵.

Com radiações de baixa transferência linear de energia, (raios gama, raios X de alta energia, elétrons de 2 Mev) a maioria das ionizações é isolada, de maneira que OH^\bullet e e^- são as espécies principais⁵ quando a irradiação ocorre em solução aquosa. Estas espécies são respectivamente poderosos agentes oxidantes e redutores. Os radicais hidroxil reagem com velocidades diferentes com os aminoácidos, dependendo da natureza e tamanho de sua cadeia lateral. Com cadeias alifáticas a principal reação é a abstração de um hidrogênio do carbono alfa. Esta reatividade depende diretamente do comprimento da cadeia lateral, sendo a velocidade de reação maior com aminoácidos de cadeia lateral maior. Com aminoácidos cuja cadeia lateral encerra um grupamento aromático, as reações ocorrem principalmente no anel^{5,2}.

Ao reagir com cisteína, o radical hidroxil abstrai o hidrogênio da sulfidril, gerando o radical SR^\bullet que pode reagir posteriormente para formar radicais do tipo RSSR, podendo levar à formação de pontes S-S inter e intra cadeias ⁵.

O elétron aquoso, por sua vez atua na desaminação dos aminoácidos. Esta reação é dependente do estado de protonação do grupamento amino terminal, sendo mais eficiente quando a amina está protonada ⁵. Aminoácidos que apresentam aminas epsilon são passíveis de desaminação neste carbono e os grupamentos aromáticos também apresentam alta capacidade de reagir com o elétron aquoso ⁵.

A velocidade de reação do elétron aquoso é muito maior com peptídeos do que com aminoácidos isolados em decorrência da eletrofilicidade da ligação peptídica ⁵.

A perda de atividade biológica de proteínas irradiadas em solução tem sido atribuída a vários fatores como alterações químicas de alguns aminoácidos em seu sítio ativo, quebras de pontes dissulfeto, mudanças conformacionais devido a distúrbios nas pontes de hidrogênio ou ainda a ligações cruzadas ou cisões na cadeia polipeptídica. Também são relevantes as reações de abstração de hidrogênio, dissociativas, de adição, dimerização e adição, desprotonação, hidrólise, adição de oxigênio e transferência de hidrogênio ⁵. Dentre as propriedades biológicas, as propriedades imunogênicas parecem ser as mais radorresistentes ⁸, possibilitando o uso da radiação gama para induzir destoxicação de toxinas isoladas ^{48, 49, 50} ou venenos ^{8, 47, 62}, com manutenção de sua imunogênicidade.

O grupo de venenos da Divisão de Radiobiologia do IPEN já obteve resultados muito promissores utilizando-se desta manutenção da imunogenicidade de moléculas irradiadas para a obtenção de venenos ofídicos atenuados ^{1, 8, 47, 48, 49, 50, 62}, que se mostraram eficientes indutores de uma resposta imune humoral resultando em anticorpos neutralizantes do imunógeno na sua forma nativa ^{50,62}. Todavia, sendo os venenos ofídicos misturas complexas de proteínas com atividade tóxica e/ou enzimática ¹³, uma análise mais detalhada dos efeitos da radiação em moléculas protéicas se mostrou inviável. A estratégia mais adequada para tais estudos seria a de trabalhar com uma proteína purificada, já que em uma mistura protéica, as diversas espécies em solução atuam como aceptores dos radicais livres, acarretando um fenômeno de proteção mútua ⁶¹. Nascimento et al. ⁵⁰ utilizaram a crotoxina, principal toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, como modelo experimental para averiguar as modificações sofridas por proteínas irradiadas em solução.

Trata-se de um heterodímero composto por uma subunidade básica com atividade PLA2, e de uma subunidade ácida desprovida de atividade ²⁸. Quando isoladas, estas duas moléculas apresentam pouca ou nenhuma toxicidade, todavia, quando complexadas por ligações fracas, a molécula resultante apresenta altíssima toxicidade ¹² e especificidade por junção neuromuscular ²². O principal efeito da radiação nesta toxina foi o aparecimento de complexos de alto peso molecular (agregados) tanto na forma hidrossolúvel quanto na forma de precipitado ⁴⁹.

Aprofundando seus estudos sobre a forma solúvel destes agregados ⁵⁰, a autora observou ainda que os mesmos eram desprovidos de toxicidade, todavia induziam anticorpos neutralizantes da toxina na sua forma nativa, sugerindo a preservação de epitopos capazes de promover uma resposta imune contra determinantes antigênicos presentes tanto na crotoxina nativa quanto na crotoxina irradiada. Tal hipótese é corroborada pelo fato de mapas peptídicos de ambas as formas da toxina terem resultado em perfis semelhantes, sugerindo manutenção da estrutura primária ⁴⁹. Estudando o comportamento imunológico da crotoxina irradiada, Cardi et al. ⁹ demonstraram que a mesma era reconhecida e internalizada por macrófagos através de receptores scavenger. Estes receptores são estruturas especializadas no reconhecimento e captação de moléculas oxidadas. Uma vez ligada a estes receptores, a molécula oxidada é internalizada e processada, sendo a seguir apresentada complexada às moléculas de MHC II ⁵¹. Desta forma, a toxina oxidada pode ser captada por estes receptores e apresentada pelos macrófagos, desencadeando uma resposta imune. Comparando-se a captação da crotoxina nativa e irradiada por macrófagos peritoneais, Cardi et al. ⁹ notaram que esta última era internalizada em quantidade muito maior, o que resultaria em uma apresentação de antígeno mais eficiente. Como resultado deste processo, uma proteína irradiada se mostraria mais imunogênica, o que de fato está relatado na literatura ^{50, 56}.

O papel dos radicais livres neste processo de atenuação também foi investigado ¹.

Utilizando também a crotoxina como modelo experimental, e irradiando esta proteína na presença de aceptores específicos de radicais OH^\bullet ou elétron aquoso, observou-se que o radical hidroxila parece estar envolvido na destruição da atividade catalítica da toxina, enquanto o elétron aquoso se mostrou responsável pelas alterações de cunho estrutural. É ainda digno de nota o fato de nenhum dos radicais supracitados parecer estar envolvido na atenuação da atividade tóxica, sugerindo que a toxicidade da crotoxina está dissociada da sua atividade catalítica, corroborando a teoria de um mecanismo de ação mediado por receptor, cujo sítio de ligação está localizado em uma região distinta daquela envolvida na ação catalítica³⁶. Ensaio de biodistribuição comparando a crotoxina nativa e irradiada, mostraram que a irradiação altera a afinidade da toxina pelos tecidos em que normalmente atua⁴⁸. Utilizando técnicas imunohistoquímicas, *Cardi et al.*¹⁰ detectaram a crotoxina nativa em junções neuromusculares. No entanto, a crotoxina irradiada não foi localizada nestas estruturas que constituem o alvo farmacológico da toxina³⁰. Este fato permite explicar porquê a crotoxina irradiada tem sua atividade neurotóxica reduzida^{25, 42}.

A toxina utilizada como modelo por estes autores permitiu esclarecer alguns aspectos do efeito da radiação sobre moléculas protéicas em solução, no entanto este modelo apresenta algumas dificuldades de interpretação inerentes ao mecanismo de ação da toxina: Para que a crotoxina exerça seu efeito tóxico, é necessário que ao chegar ao seu tecido alvo, haja dissociação das subunidades que a formam²².

Em decorrência da ação dos radicais livres no complexo crotoxina, podem ser formadas ligações fracas (H-H) ⁵ ou mesmo covalentes (S-S, Tyr-Tyr) ²⁹ que impossibilitam esta dissociação, mascarando a manutenção da estrutura responsável pela toxicidade.

Assim, sabe-se que a radiação modifica as toxinas alterando sua afinidade e especificidade e a maneira com que são reconhecidas pelo sistema imune. No entanto, pouco se sabe sobre as alterações físico-químicas que a irradiação acarreta e sobre os mecanismos envolvidos na atenuação de sua atividade. No presente trabalho, nos propusemos a investigar os efeitos dos raios gama de ⁶⁰Co sobre a bothropstoxina I. Optamos por esta proteína em função da facilidade com que pode ser isolada e por haver sido caracterizada sob o ponto de vista físico-químico, constituindo um modelo adequado para a nossa finalidade.

A bothropstoxina I, primeiramente isolada por Homsí-Brandenburg et al. ³³ é uma miotoxina do veneno de *Bothrops jararacussu* e, apesar de não apresentar atividade catalítica, pode ser considerada uma fosfolipase A2, pois apresenta altíssima homologia com as fosfolipases A2 de classe II de venenos das serpentes da família Crotalidae ^{14,24} conforme pode ser observado adiante:

Tabela 1: comparação de seqüência de várias fosfolipases A2. As seqüências foram alinhadas pelos resíduos de meia-cistinas.

		10	20	30	40
pancreática	ALWQFNGMI	KCKIP SSEPL	LDFN NYGCYC	GLGGSGTPV-	-----DDLDR
bovina					
<i>Naja naja atra</i>	NLYQFKNMI	QCTPV-SRSW	WDFADYGCYC	GRGGSGTPV-	-----DDLDR
<i>Naja naja naja</i>	NLYQFKNMI	KCTVP-SRSW	WDFADYGCYC	GRGGSGTPV-	-----DDLDR
humana	NLVNFHRMI	K-LTTGKEAA	LSYGFYGCYC	GVGGRGSPK-	-----DATDR
<i>Crotalus atrox</i>	SLVQFETLI	M-KIAGRSGL	LWYSAYGCYC	GWGGHGLPQ-	-----DATDR
<i>Bothrops asper</i>	SLFELGKMI	L-QETGKNPA	KSYGAYGCNC	GVLGRGKPK-	-----DATDR
BthTX-I	SLFELGKMI	L-QETGKNPA	KSYGAYGCNC	GVLGRGKPK-	-----DATDR
<i>Agkistrodon</i>	SVLELGKMI	L-QETGKNAI	TSYGSYGCNC	GWGHRGQPK-	-----DATDR
	50	60	70	80	90
pancreática	CCQTHDNCYK	QAKKLD SCKV	LVDN PYTN NY	SYSCSNNEIT	CSSENNACEA
bovina					
<i>Naja naja atra</i>	CCQVHDNCYN	EAEKISGCW-	----PYFKTY	SYECSOGTLT	CKGGNNACAA
<i>Naja naja naja</i>	CCQVHDNCYN	EAEKISGCW-	----PYFKTY	SYECSOGTLT	CKGDNNACAA
humana	CCVTHDCCYK	RLEK-RGCG-	----TKFLSY	KFSNSGSRIT	C-AKQDSCRS
<i>Crotalus atrox</i>	CCFVHDCCYK	KAT---DCN-	----PKTVSY	TYSEENGEII	C-GGDDPCGT
<i>Bothrops asper</i>	CCYVHKCCYK	KLT---GCN-	----PKKDRY	SYSWKDKTIV	C-GENNSCLK
BthTX-I	CCYVHKCCYK	KLT---GCN-	----PKKDRY	SYSWKDKTIV	C-GENNPCLK
<i>Agkistrodon</i>	CCFVHKCCYK	KLT---DCN-	----HKTDRY	SYSWKNKALII	C-EEKNPCLK
	100		110	120	
pancreática	ICNCDRNAA	ICFSK-----	VPYNKEHKNL	D-KKN-C---	
bovina					
<i>Naja naja atra</i>	VCDCDRLAA	ICFAG-----	APYNDNDYNI	NLKAR-C---	
<i>Naja naja naja</i>	VCDCDRLAA	ICFAG-----	APYNDNNYNI	DLKAR-CQ--	
humana	LCECDKAAA	TCFARN---K	TTYNKK-YQY	YSNKH-CRGS	TPRC
<i>Crotalus atrox</i>	ICECDKAAA	ICFRDN---I	PSYDNK-YWL	FPPKD-CREE	PBPC
<i>Bothrops asper</i>	LCECDKAVA	ICLREN---L	NTYNKK-YRY	YLKPL-CK-K	ADAC
BthTX-I	LCECDKAVA	ICLREN---L	GTYNKK-YRY	HLKPH-CK-K	ADPC
<i>Agkistrodon</i>	MCECDKAVA	ICLREN---L	DTYNKK-YKA	YFKLK-CK-K	PDTC

As fosfolipases catalisam a hidrólise da ligação ester na posição 2-acil dos L-fosfolípidos conforme a figura abaixo:

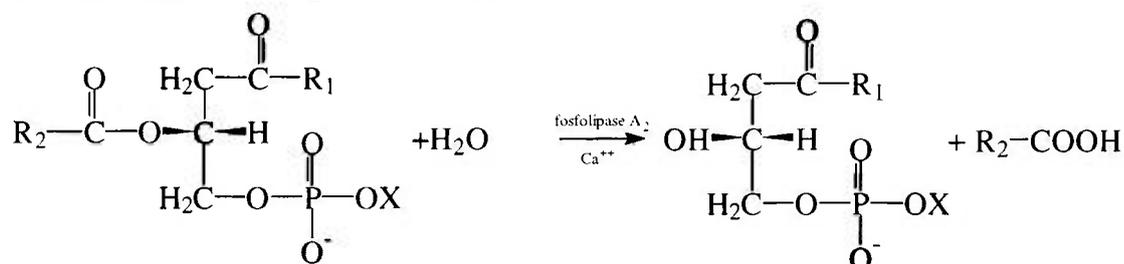


Figura 1: mecanismo catalítico das PLA₂. X representa o grupamento polar do fosfolípide.

As fosfolipases são enzimas pequenas e globulares e têm uma vastíssima ocorrência, sendo encontradas em amostras biológicas diversas como pâncreas, onde exercem função digestiva, células do sistema imune, onde atuam como mediadoras da resposta inflamatória e venenos animais, onde desempenham papel tóxico e digestivo ²⁶.

Apesar da similaridade, as PLA₂ podem ser divididas em diferentes grupos ou classes. O grupo I encerra as enzimas de origem pancreática de mamíferos, assim como as fosfolipases de venenos elapídicos e hidrofídicos ⁵⁴. O grupo 2: compreende as fosfolipases A₂ de venenos crotálicos ⁵⁴ além daquelas encontradas no líquido sinovial humano e daquela secretada por plaquetas durante processos inflamatórios ¹⁷ e o grupo 3: engloba as enzimas secretadas por himenópteras e lagartos ²⁶.

Estes três grupos se caracterizam pela grande quantidade de pontes S-S (5 ²⁶ a 7 ¹¹), peso molecular em torno de 14.000 Daltons e dependência de cálcio ³⁴ para a atividade catalítica.

Além de sua ação catalítica as fosfolipases A₂ de venenos ofídicos apresentam especificidades teciduais e ação farmacológica conforme exemplificado na tabela abaixo:

Tabela 2: comparação de várias fosfolipases A₂ com relação a seu efeito farmacológico e especificidade tecidual.

Toxina	Efeito farmacológico	origem
Miotoxina II	miotoxicidade	<i>Bothrops asper</i>
PLA ₂	cardiotoxicidade	<i>Naja nigricollis</i> <i>Bungarus fasciatus</i>
Crotoxina	neurotoxicidade	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
-bungarotoxina		<i>Bungarus sp.</i>
PLA ₂	anticoagulante	<i>Naja nigricollis</i>

As diferenças de especificidade e de tecido alvo têm sido atribuídas às diferenças de distribuição de cargas na superfície das toxinas, assim como a regiões fixas observadas em toxinas de diferentes origens, que todavia exercem o mesmo efeito ³⁶. Assim, a estrutura primária, e a estrutura terciária resultante, seriam determinantes do tipo de ação exercido pela toxina.

A atividade catalítica da PLA₂ é dependente de cálcio. Este íon interage com a enzima na região do sítio ativo e se encontra rodeado por 7 oxigênios ligantes que são os oxigênios da carbonila de Tyr28, Gly30 e Gly32, e os oxigênios da carboxila de Asp49 ²⁶.

O ácido aspártico 49 é fundamental para a ligação do cálcio por fornecer uma carga para equilibrar o cátion e dois átomos de oxigênio como ligantes. Participam também a amina do resíduo amino-terminal, a glutamina da posição 4, o oxigênio da asparagina 71, bem como uma molécula de água²⁶. Se observarmos a estrutura primária da bothropstoxina 1¹⁴, veremos que a maioria destes aminoácidos foi alterada.

Tabela 3: comparação entre as fosfolipases A₂ com atividade catalítica e a bothropstoxina com relação aos aminoácidos envolvidos na ligação de cálcio.

Fosfolipase A ₂	Bothropstoxina 1
glutamina 4	ácido glutâmico
tirosina 28	glutamina
glicina 32	leucina
ácido aspártico 49	lisina
asparagina 71	ácido aspártico

A ausência de atividade catalítica da bothropstoxina, assim como de outras miotoxinas Lys 49, pode ser atribuída a estas mutações que resultam na incapacidade de ligar o cálcio no sítio ativo^{14, 24}, impossibilitando a orientação correta do substrato e a conseqüente transferência de hidrogênio da molécula de água para o ácido graxo da posição sn2 do fosfolipídeo²⁶. Apesar de desprovidas de atividade catalítica, as fosfolipases A₂ K49 são altamente miotóxicas. O seu mecanismo de ação, assim como o fator responsável pela sua especificidade tecidual ainda não estão bem claros. Alguns autores sugerem tratar-se de um novo tipo de mecanismo citolítico baseado na acilação autocatalítica da toxina⁵⁵.

Segundo estes autores, as miotoxinas ligam ácidos graxos de cadeia longa de maneira covalente, por meio de um mecanismo autocatalítico. Estes ácidos graxos estariam ligados pelo grupamento carboxila, ficando a cadeia carbônica móvel. Ainda segundo estes autores, o complexo proteína-ácido graxo se ligaria á membrana celular inserindo a cauda apolar do ácido graxo na bicamada lipídica, desestabilizando a mesma. Esta hipótese sugere um mecanismo de ação, porém não esclarece a marcante afinidade por células musculares que a bothropstoxina apresenta.

Giotto ²⁶, assim como Fletcher *et al* ²³ sugerem que a especificidade da toxina por tecido muscular seja mediada por receptores, entretanto nenhum estudo cinético ou histoquímico que confirme tal hipótese foi realizado ainda.

Foi demonstrado também que a remoção do octapeptídeo n-terminal (NH₂-Ser-Leu-Phe-Glu-Leu-Gly-Lys-Met) com CNBr da miotoxina II de *B. asper* levava a uma diminuição significativa da miotoxicidade ¹⁹, não ficando claro porem, se tal fato decorria da participação direta da porção n-terminal na ação tóxica ou de modificações conformacionais que tal clivagem ocasionaria. O mesmo grupo apresentou também evidências de que um peptídeo da porção C-terminal (resíduos 115-129) da mesma proteína tinha atividade citolítica *in vitro*, e que anticorpos contra este peptídeo inibiam a atividade miotóxica da toxina ^{6,7}.

Apesar das diferenças que as miotoxinas apresentam em relação às PLA₂ no que se refere a estrutura primária e mecanismo de ação, as suas estruturas secundária e terciária apresenta marcante homologia com aquelas descritas para fosfolipases A₂ do grupo 2.

Como se pode observar na figura abaixo (figura 2) a molécula de BthTx-1 é formada por duas alfa-hélices antiparalelas (hélices 2 e 3) ligadas por pontes dissulfeto, definindo uma estrutura rígida à qual o “loop” de ligação de cálcio, a porção C-terminal e a asa beta estão covalentemente ligados por pontes S-S. A hélice N-terminal (hélice 1) é estabilizada por contatos entre suas cadeias laterais com aquelas da asa beta e do corpo da proteína ⁶⁷.

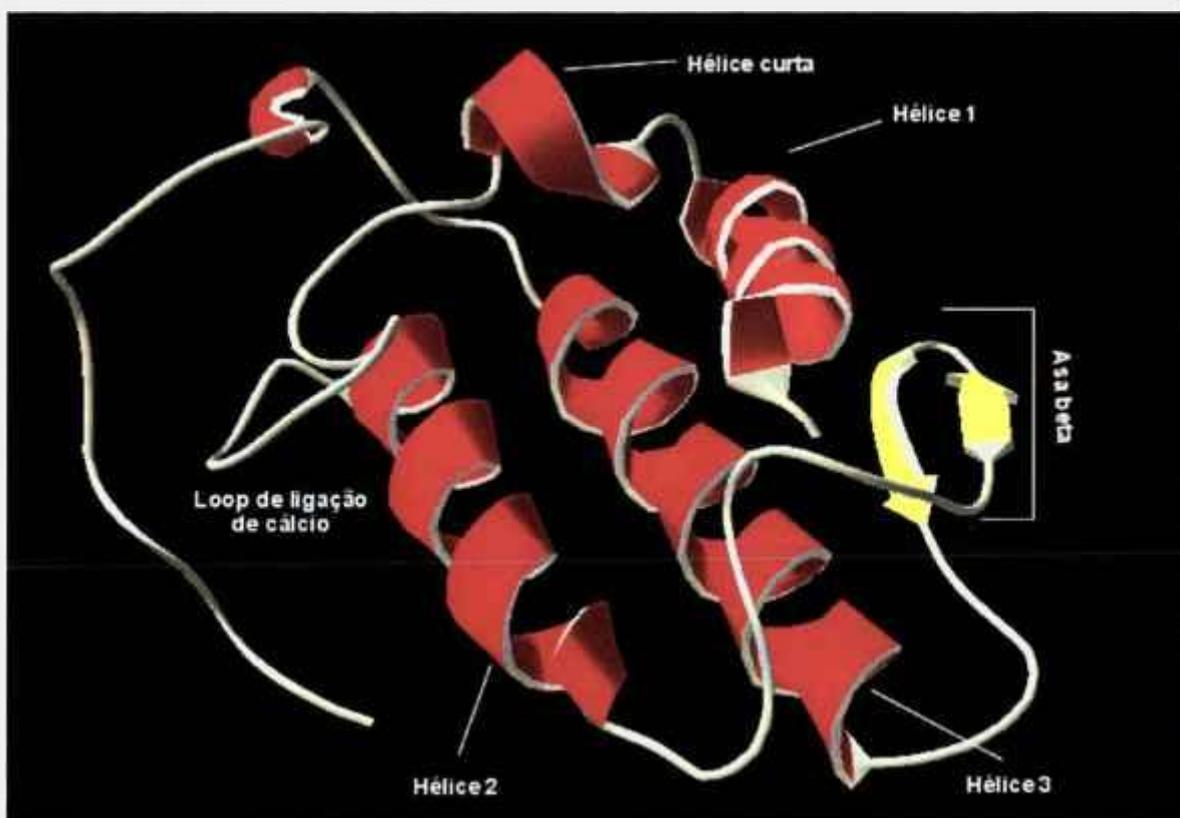


Figura 2: estrutura do monômero da BthTx-1.

De acordo com dados cristalográficos ²⁶, a bothropstoxina-1 ocorre na forma de um homodímero. A interface de contato entre as subunidades é bastante hidrofílica, envolvendo uma ponte salina entre E12 de uma subunidade e K80 da outra e pontes de hidrogênio entre os resíduos 77 e 11, 80 e 80 e 14 e 7.

Contatos hidrofóbicos são feitos pelos resíduos Trp 77 e Val10 com seus parceiros simétricos (figura 3).



Figura 3: estrutura quaternária da bothropstoxina-1. As cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos na interação entre as subunidades do dímero estão exibidas.

Selistre de Araújo *et al.*⁶⁰ procuraram identificar os aminoácidos envolvidos na miotoxicidade por comparação de seqüências. Analisando dezessete PLA₂, estes autores observaram que os resíduos K7, E12, T13, K16 e N17, associados às lisinas K78, K80, K116 e K117 formam um domínio miotóxico potencial por estarem conservados em todas as miotoxinas.

As miotoxinas não são componentes compartilhados por todas as serpentes do gênero *Bothrops*^{44, 45} e representam um problema na clínica e terapia²⁰.

Nos envenenamentos com serpentes cujo veneno encerra miotoxinas, a soroterapia com o soro específico (antibotrópico) é eficiente na neutralização dos efeitos sistêmicos, mas a ação dos componentes miotóxicos não é neutralizada, resultando em dano tecidual local ²⁰. Como consequência, observa-se uma intensa mionecrose, caracterizada pelo aparecimento de altos níveis de creatina-quinase sérica ²⁰.

O pico de liberação desta enzima, em camundongos, ocorre entre a terceira e a sexta hora após a injeção da toxina ²⁰, e é acompanhado de hemoglobinúria e intensa dor local. Estudos histológicos ⁵³ mostraram que as miotoxinas Lys49 induzem mionecrose com efeitos visíveis 15 minutos após a inoculação. A necrose é caracterizada por rompimento da membrana plasmática e hipercontração das miofibrilas, seguida da dissolução dos componentes celulares.

Vital Brazil ⁴, no início do século, já havia observado que o soro polivalente (antibotrópico-crotálico) se mostrava mais eficiente que o soro específico na neutralização do veneno de *B. jararacussu*. Tal fato foi confirmado por dos Santos et al ²⁰, sugerindo estes que estaria ocorrendo uma reação cruzada dos anticorpos anti PLA2 (componente da crotoxina) com as miotoxinas do veneno de *B. jararacussu*. Dias da Silva et al ¹⁸, observaram que o veneno de *B. jararacussu* se comportava como um imunógeno fraco, não sendo neutralizado de modo eficiente nem por antissoro homólogo, tampouco por soro antibotrópico polivalente.

Por outro lado, Moura da Silva et al ⁴⁵ atribuíram a este veneno boa imunogenicidade, devendo se ressaltar que os animais utilizados para a imunização nos dois trabalhos acima citados foram cavalos e camundongos isogênicos respectivamente, havendo também diferenças nas vias de inoculo e no tipo de adjuvante.

Em experimentos realizados em nosso laboratório ⁶², pudemos observar que coelhos imunizados com veneno total de *B. jararacussu* nativo ou irradiado com 2000 Gy apresentavam títulos de anticorpos semelhantes. No entanto, os anticorpos induzidos por veneno irradiado neutralizavam a ação miotóxica do veneno nativo, o que não ocorria com os anticorpos antiveneno nativo, sugerindo diferenças qualitativas nas imunoglobulinas produzidas contra o antígeno na sua forma nativa ou irradiada. A análise qualitativa dos anticorpos produzidos contra as duas formas do veneno de *B. jararacussu* por western blot corrobora esta hipótese, já que o soro antiveneno irradiado reconheceu bandas do veneno nativo que não foram reconhecidas pelo soro antiveneno nativo ⁶². Tais fatos sugerem que a irradiação alterou a estrutura da toxina, estimulando clones de célula B produtores de anticorpos neutralizantes.

As modificações que a radiação acarreta em toxinas ainda não foram plenamente caracterizadas, o que dificulta a aceitação de tais toxoides como imunógenos para a produção de soros de uso terapêutico. Nosso intuito no presente trabalho foi investigar os efeitos da radiação em uma toxina modelo.

2 Objetivos

1-Estudar após irradiação as principais modificações estruturais responsáveis pela alteração das características imunológicas da miotoxina, levando uma proteína de baixa imunogenicidade a induzir uma resposta imune humoral eficiente.

2-Proceder à análise físico-química da toxina irradiada, visando determinar as modificações sofridas pela toxina após a irradiação.

3-Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais contra a bothropstoxina-1 nativa e irradiada.

3 Material e métodos:

3.1 Purificação da bothropstoxina-1:

Alíquotas de veneno total de *B. jararacussu* cristalizado (Instituto Butantan) foram diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 para uma concentração de 25 mg/ml. Esta solução foi então centrifugada a 14.000 RPM em uma microcentrifuga (Eppendorf). O sobrenadante foi filtrado em uma membrana com poro de 0,22 µm. O filtrado foi injetado em uma coluna de troca catiônica Resource-S de 1 ml conectada a um sistema FPLC (Pharmacia), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,8 (tampão A). O tampão B consistiu de fosfato de sódio 25mM/NaCl 2M pH 7,8. Após a injeção, a coluna foi lavada com 10 ml de 7,5% de B (NaCl 150 mM) para eluição da fração não adsorvida à matriz com um fluxo de 2,5 ml/minuto. Iniciou-se então um gradiente linear (1%/ml) do tampão B por 25 ml. A coluna foi então regenerada com 10 ml de tampão B, seguidos de 10 ml de A. A absorvância do eluato foi monitorada a 280 nm.

3.2 Dosagem de proteínas:

A concentração de proteínas foi estimada pelo método do ácido bicinônico (Pierce), de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando-se albumina bovina sérica (Sigma) como padrão. Todas as dosagens foram feitas em triplicata.

3.3 Determinação da pureza:

As frações correspondentes ao pico da bothropstoxina-1 foram agrupadas e dialisadas exaustivamente contra água deionizada. Este material foi então congelado e liofilizado.

3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Uma alíquota de 25 µg da fração purificada foi diluída em tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e aquecida a 95°C por 5 minutos. Esta foi então aplicada em um gel de poliacrilamida a 15% (100x80x0.75 mm) utilizando o sistema de tampões descrito por Schagger et al.⁵⁸, por apresentar este melhor resolução que o sistema anteriormente descrito por Laemmli³⁹. No mesmo gel aplicou-se padrões de peso molecular conhecido (Novex). A corrente foi fixada em 20 mA. Finda a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie blue 250-R.

3.3.2 Seqüenciamento N-terminal:

20 µg de bothropstoxina-1, dissolvidos em água deionizada foram enviados para o Centro de Seqüenciamento de Proteínas, Análise de Aminoácidos e Síntese de Peptídeos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Após redução e carboximetilação, a amostra foi analisada por degradação de Edman²¹ em um seqüenciador automático Applied Biosystems 473 A. Foram realizados cinco ciclos de degradação.

3.4 Irradiação das amostras:

Amostras de bothropstoxina 1 (2 mg/ml em NaCl 150 mM) foram irradiadas com as doses de 500, 1000 ou 2000 Gy, a temperatura ambiente e na presença de oxigênio atmosférico. Como controle, alíquotas das amostras foram mantidas nas mesmas condições acima com exceção da radiação. Cabe ressaltar que devido a alta atividade da bomba de cobalto utilizada, tivemos de utilizar uma blindagem de 90% para mantermos uma taxa de dose compatível com

experimentos realizados anteriormente ⁶². Com o auxílio da blindagem obtivemos uma taxa de dose de 1666 Gy/h.

3.5 Análise das alterações estruturais:

3.5.1 Espectrometria de massa

Após a irradiação, 5 µl da toxina nativa ou irradiada (400µg/ml) foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) conectado a uma coluna capilar de fase reversa C8 (250 mm X 180 µm, Vydac, tamanho da partícula =5µm) com fluxo de 2 µl/minuto e com um gradiente de 5 a 100% de fase móvel B em 60 minutos. As fases móveis A e B consistiam respectivamente de 0,1% de ácido fórmico e 80% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico. A absorvância do eluato foi monitorada a 214 nm em um detector de ultravioleta. A saída do detector por sua vez estava conectada a um espectrômetro de massa (Finnigan TSQ 700) permitindo assim a injeção da amostra após a remoção do sal. Este aparelho é um triplo quadripolo no qual a amostra é ionizada por "electrospray" (U=-3800 volts) . A janela de detecção utilizada foi de 300 a 2000 M/z e o tempo de varredura foi de 2 segundos.

3.5.2 Determinação da massa da bothropstoxina-1:

Após analisar a bothropstoxina-1 por espectrometria de massa, foi necessário calcular o peso molecular da mesma a partir dos picos obtidos. Para tal, baseamo-nos no algoritmo abaixo descrito:

Parte-se do princípio que dois picos de massa adjacentes (m_1 , m_2) diferem por um número de carga.

Considerando-se este fato, as equações abaixo podem ser utilizadas para determinar as cargas (n_1 , n_2) e a massa molecular (M) de um dado composto:

$$n_2 = n_1 - 1 \quad (\text{com } m_2 > m_1 \text{ e } n_2 < n_1)$$

$$n_2 = \frac{(m_1 - m_a)}{(m_2 - m_1)}$$

$$M = n_2(m_2 - m_a)$$

Onde m_1 representa a razão carga-massa do primeiro pico; m_2 é a razão m/z do segundo pico e m_a é a massa do íon aduto. Trabalhando em modo positivo, este é um próton, logo m_a será igual a 1u. Utilizando-se a razão carga-massa de dois picos consecutivos é possível resolver as equações acima e determinar a massa da molécula de interesse.

3.5.3 Espectrometria de massa por desorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF):

Por motivos técnicos, trocamos o “electrospray” pelo MALDI-TOF. Esta metodologia, ao invés de se basear na deflexão da proteína ionizada quando submetida a um campo eletromagnético, baseia-se no tempo que a molécula leva para atingir o detector após ter sido vaporizada por um feixe de laser. Quanto maior a razão carga/massa de um dado composto, menor o seu momento e maior a sua velocidade. Este tipo de aparelho apresenta maior sensibilidade (10^{-15} M) e reprodutibilidade, todavia a sua resolução e precisão e são sensivelmente menores (H. Hines, comunicação pessoal).

As amostras (1 μ l de BthTx-1 a 2 mg/ml em NaCl 150 mM) foram diluídas em 1 μ l de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico a 10 mg/ml em acetonitrila com 0,1 % de ácido trifluoroacético e analisadas em um aparelho Voyager-DE (Perseptive Biosystems) conforme as condições abaixo:

- Voltagem de aceleração: 20000 volts
- Pressão: 2.8×10^{-7} mm Hg
- Laser: N₂ .
- Comprimento de onda do laser: 337 nm
- Pulso do laser: 3 ns, com 20 pulsos por segundo.
- Comprimento do tubo de vôo: 1,2 m.

Os dados foram analisados utilizando o software Voyager do mesmo fabricante.

3.5.4 Dicroísmo circular:

Amostras da toxina nativa e irradiada, dissolvidas em NaCl 150 mM foram dialisadas "overnight" contra fosfato de sódio 10 mM pH 7 e diluídas para uma concentração protéica final de 200 μ g/ml. Em uma alíquota das amostras, adicionou-se 2-mercaptoetanol para uma concentração final de 2mM. Para cada amostra, foi feito um branco, consistindo de todos os reagentes com exceção da proteína. A elipticidade das amostras foi então determinada em um espectropolarímetro JASCO J 600.

3.5.5 Desnaturação térmica

Este ensaio foi realizado visando determinar a entalpia associada à toxina na sua forma nativa ou irradiada. Para tal, procedeu-se a um ensaio de desnaturação térmica monitorado por dicroísmo circular. Bothropstoxina-1, nativa e irradiada, foi ensaiada em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7 ou acetato de sódio 20 mM pH 4. A amostra foi colocada em uma cubeta termostaticada por efeito Peltier acoplada ao espectropolarímetro. A seguir, procedeu-se a um aquecimento gradual (1°C/minuto) iniciando-se o ensaio a 20°C, elevando-se a temperatura até 90°C. A presença de estrutura secundária foi monitorada a 222 nm. O sinal foi registrado a cada meio minuto. Os dados foram tratados como termodinâmica com equilíbrio de segunda ordem, baseando-se na equação de Gibbs-Helmoltz:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(\left(1 - \frac{T}{T_m} \right) + \Delta C_p \left(T - T_m - T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right) \right)$$

Onde $\Delta G(T)$ representa a diferença de energia à temperatura T ; T_m , a temperatura de fusão; ΔH_m a variação de entalpia na temperatura de fusão; e ΔC_p a diferença de capacidade térmica entre as formas nativa e desnaturada. Esta equação se baseia nas seguintes premissas:

- (i) O processo de desnaturação é uma reação de dois estados (two state reaction), isto é, a proteína passa do estado nativo para o estado denaturado sem que haja um estado intermediário.
- (ii) $G(T)$ é positivo, ou seja, existe uma temperatura na qual a proteína é estável.
- (iii) ΔC_p é constante e finito.⁵⁹

Baseando-se nestas premissas, o ponto de fusão e a entalpia de Van't Hoff das amostras foram calculados em um programa de computador elaborado pelo Dr. J. Carra (U.S. Army Medical Research Institute for Infectious Diseases).

3.5.6 Recromatografia da toxina irradiada

Após a irradiação com 2000 Gy, 10mg de BthTx-1 foram injetadas em uma coluna de Sephacryl-S200 HR com o intuito de separar eventuais formas de maior peso molecular. A fase móvel utilizada foi fosfato de sódio 50 mM e o fluxo foi de 0,3 ml/minuto. Foram coletadas frações de 1 ml. Após a cromatografia, selecionou-se os tubos mais representativos de cada pico.

3.5.7 Fluorescência

Os espectros de fluorescência da toxina nativa, da fração de menor peso molecular e da fração de maior peso molecular foram obtidos em espectrofluorímetro Hitachi F-4500, com a temperatura estabilizada em 25°C. As medidas foram feitas em célula de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Os parâmetros foram: excitação 295 nm e emissão em 300-450 nm com abertura para emissão mais excitação de 5 nm, e voltagem na fotomultiplicadora de 950 V. Os controles foram feitos nas mesmas condições, depois subtraídos dos espectros encontrados para as proteínas, e a intensidade da emissão foi calculada pela integração total entre 305-450 nm.

3.5.8 Supressão da Fluorescência

Os experimentos de supressão com acrilamida foram feitos em diversas concentrações. A acrilamida foi adicionada seqüencialmente para a concentração final de 313 mM. A intensidade final foi corrigida para os efeitos de diluição, e a supressão de fluorescência calculada usando a relação $[(F/F_0)]$, onde F e F_0 são as medidas das intensidades com e sem a adição de acrilamida respectivamente. As constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) foram obtidas para um gráfico de $[(F_0/F) - 1]$ X concentração de acrilamida por regressão linear.

Tendo esta metodologia se mostrado válida para a análise comparativa da toxina nativa ou irradiada com 2000 Gy, procedemos aos ensaios de supressão de fluorescência mediada pelo solvente (solvent quenching) das amostras nativas e irradiadas com 500, 1000 e 2000 Gy na forma nativa ou reduzida e em pH 5 ou 7. Nesta análise, uma maior exposição do fluoróforo (triptofano 77) ao solvente resulta em uma menor intensidade de fluorescência, em decorrência das colisões das moléculas de água com o anel aromático. Assim, qualquer alteração na conformação da interface de interação monômero-monômero será detectada por uma alteração da fluorescência.

3.6 *Análise computacional e modelagem molecular:*

Todas as análises computacionais de estrutura, hidrofobicidade e acessibilidade ao solvente foram feitas pelos computadores do banco de dados de proteínas Swissprot (www.expasy.ch) a partir da estrutura primária da bothropstoxina-1 descrita na literatura ¹⁴ e da estrutura cristalográfica descrita por Giotto ²⁶.

3.7 Produção de anticorpos monoclonais:

3.7.1 Imunização:

Foram formados 4 grupos de 5 camundongos Balb/c machos (Charles River FCRF) , pesando 20 ± 2 g. Utilizou-se bothropstoxina nativa ou irradiada com 2000 Gy como antígeno conforme o protocolo abaixo:

Grupo	Antígeno	dose ($\mu\text{g}/\text{animal}$)
1	bothropstoxina nativa	5
2	bothropstoxina nativa	10
3	bothropstoxina irradiada	5
4	bothropstoxina irradiada	10

O primeiro e segundo inóculos foram feitos emulsificando-se o antígeno em adjuvante de Ribí reconstituído, por ser este um adjuvante que não promove reações adversas . As diluições foram feitas a partir de uma solução mãe a 2mg/ml conforme abaixo:

50 μl de toxina +450 μl de NaCl 150 mM + 500 μl de adjuvante de Ribí reconstituído * =1,0 ml

* Para reconstituir o adjuvante, bastou aquecê-lo a 37°C, adicionar NaCl 150 mM e agitá-lo até obter uma emulsão.

Foi feito um terceiro inóculo dissolvendo-se o antígeno em NaCl 150 mM . Nestes três primeiros inóculos a via utilizada foi a sub-cutânea. O intervalo entre as imunizações foi de quinze dias. Três dias antes de sacrificar os animais, os mesmos foram estimulados com as mesmas dosagens pela via intra-peritoneal.

3.7.2 Fusão

Após eutanásia por deslocamento cervical, o baço de um animal de cada grupo foi removido assepticamente e transferido para um tubo cônico estéril contendo 25 ml de meio OPTI-MEM (Gibco BRL) em banho de gelo. Os baços foram cortados em pedaços com tesouras estéreis. A seguir , transferiram-se os mesmos para uma tela metálica de malha fina, no topo de um tubo cônico de 50 ml, também em banho de gelo. Após remover restos de tecido conectivo, os baços foram reduzidos a pedaços cada vez menores com o auxílio de tesouras estéreis. Com os baços ainda na tela, lavaram-se os mesmos com 10 ml de solução de lise de hemáceas (cloreto de amônio em tris 10mM pH 7.5), agitando-se o homogenato e macerando-o com um bastão de vidro, aplicando-se uma ligeira pressão sobre o tecido para forçar as células tubo abaixo. Finda esta etapa, as células obtidas foram incubadas por 10 minutos em banho de gelo. As células de mieloma de camundongo foram lavadas 2 vezes (1000 RPM, 4°C, 5 minutos) e ressuspensas em 25 ml de meio OPTI-MEM (sem soro fetal) gelado, complementado com gentamicina e fungizona. As células foram contadas e sua viabilidade avaliada com Trypan Blue em um hemocitômetro, após uma diluição 1:10 em meio e uma segunda diluição 1:2 no corante.

A seguir as células de Baço e de mieloma foram novamente centrifugadas (1000 RPM, 4°C, 5 minutos) e ressuspendidas em meio fresco . As células de baço foram então misturadas com as de mieloma de modo a obter uma relação célula de baço/célula de mieloma entre 6/1 e 10/1. Após ligeira agitação, as células foram recentrifugadas (750 RPM, 5 minutos a temperatura ambiente). Descartou-se o sobrenadante e as paredes do tubo foram cuidadosamente secas com algodão estéril, no intuito de remover todo o líquido possível, evitando diluição do polietileno glicol. O tubo contendo as células foi então transferido para um banho termostaticado regulado para 37°C. Iniciou-se então a fusão celular. 2 ml de polietileno glicol (PEG 1500, Boeringer Mannheim) previamente aquecido a 37°C foram adicionados as células em um minuto, pela parede do tubo e sob ligeira agitação, mantendo-se as células aquecidas. As células foram então recentrifugadas (750 RPM, temperatura ambiente) . Devido a fragilidade da membrana celular na presença de PEG, ao invés de programar a velocidade de rotação desejada, aumentou-se paulatinamente a mesma ate alcançar a rotação desejada. A partir deste ponto, centrifugaram-se as células por 30 segundos e esperou-se pela parada total do rotor antes de remover o tubo. Retornou-se o mesmo para o banho termostaticado e 2ml de meio previamente aquecido foram adicionados em 2 minutos com ligeira agitação. Continuando a diluição do PEG, adicionaram-se mais 10 ml de meio aquecido em dois minutos. Repetiu-se este ultimo procedimento mais uma vez, totalizando 2ml de PEG+2ml meio+10 ml de meio+ 10ml de meio=24ml.

As células foram então centrifugadas a temperatura ambiente, tomando-se os mesmos cuidados acima descritos no que se refere a aceleração. Após descartar o sobrenadante as células foram ressuspensas em 25 ml de meio OPTI-MEM contendo 0.2 mM de hipoxantina, 0.8 μ M de aminopterina 32 μ M de timidina e 20% de soro fetal bovino (note-se que todos os reagentes estão com o dobro da concentração desejada , já que a suspensão celular será diluída 1:2 nas placas de microtitulação contendo o " feeder layer"). Uma vez ressuspensas as células, estas foram transferidas para um frasco contendo 80 ml de meio OPTI-MEM adicionado de HAT e soro fetal conforme acima. Transferiram-se então 100 μ l da suspensão celular para placas de microtitulação de 96 poços (10 placas para o animal imunizado com toxina nativa, 10 placas para o animal imunizado com toxina irradiada) contendo 100 μ l de meio e previamente acondicionadas com macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (feeder layer). As placas foram então levadas para incubadoras de CO₂ e, decorridos 15 dias, coletou-se o sobrenadante para análise.

3.7.3 Screening dos clones

Os sobrenadantes dos clones obtidos foram testados individualmente por ensaio imunoenzimático (ELISA) contra a forma autóloga do antígeno (anti-nativo x toxina nativa e anti-irradiado x toxina irradiada). Para tal utilizaram-se placas de microtitulação sensibilizadas com 10 μ g/ml de toxina em tampão carbonato pH 9.6. O segundo anticorpo consistiu de uma IgG de cabra anti-igG de camundongo conjugada com peroxidase e como cromógeno usou-se 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-ácido sulfônico) diamônio.

Foram incluídos controles positivos e negativos em duplicata. Após uma primeira varredura, os clones positivos foram transferidos para placas de 24 poços e, decorridos 15 dias, os sobrenadantes foram novamente testados por ELISA. Cabe ressaltar que, nesta etapa, todos os clones foram testados contra o antígeno na forma nativa e irradiada visando identificar anticorpos capazes de discriminar as duas formas do antígeno.

3.7.4 Análise dos clones positivos por ressonância plasmônica de superfície

Tendo em vista o grande número de clones positivos obtidos na primeira varredura, optamos por subclonar apenas células que produzissem anticorpos contra regiões diferentes da toxina. Primeiramente, dividiram-se os clones em altamente reativos, mediamente reativos e fracamente reativos. Tal propriedade foi investigada utilizando um aparelho BIACORE (Biacore AB). Em uma primeira etapa, ativou-se um “chip” CM5 para acoplamento por grupamentos amina. Em uma célula de fluxo imobilizou-se BthTx-1 nativa e em outra BthTx-1 irradiada. A superfície foi então bloqueada com etanolamina. Os sobrenadantes dos clones (20 μ l) foram então testados contra estas duas superfícies. Após cada injeção, o anticorpo adsorvido foi removido pela injeção de 5 μ l de glicina 100 mM pH 3. Os padrões de reatividade foram examinados e selecionaram-se apenas anticorpos que tivessem alta reatividade ou discriminassem entre toxina nativa e irradiada.

A seguir, utilizando o mesmo tipo de “chip, imobilizou-se IgG de coelho anti Fc de IgG de camundongo.

Em seguida, injetou-se um dos anticorpos a ser analisado. Em decorrência da presença de anticorpos anti Fc de camundongo, este permaneceu ligado à superfície. Eventuais sítios reativos remanescentes foram bloqueados com gamaglobulina de camundongos não imunizados. A próxima injeção consistiu de BthTx-1 nativa ou irradiada. Desta forma obteve-se uma superfície apresentando todos os epitopos da toxina com exceção daquele pelo qual a mesma estava ligada ao anticorpo ligado à IgG de coelho, possibilitando ensaios de competição. De acordo com dados cristalográficos ²⁶, a bothropstoxina-1 ocorre na forma dimérica, o que implicaria em um sítio reativo adicional para o anticorpo pelo qual a toxina está adsorvida. Para eliminar esta variável, o mesmo anticorpo utilizado na adsorção foi reinjetado, visando bloquear o epitopo remanescente do dímero. Os anticorpos a serem testados foram então injetados seqüencialmente. Tendo em vista o fato de uma imunoglobulina ter um tamanho cerca de 11 vezes maior do que aquele da toxina investigada, existia a possibilidade de, após a adsorção de alguns dos anticorpos a serem investigados, ocorrer impedimento estérico e mascaramento de epitopos ainda disponíveis. Assim, optou-se por variar as seqüências de injeção, de forma a assegurar que todas as imunoglobulinas testadas tivessem acesso ao seu epitopo. Entre as seqüências de injeção, os ligantes foram removidos com glicina conforme acima descrito.

3.7.5 Subclonagem dos clones de interesse

Os clones selecionados de acordo com a metodologia acima descrita foram subclonados por diluição limitante conforme abaixo:

Para cada clone a ser subclonado, preparou-se 2 placas de microtitulação, contendo 150 μ l de meio OPTI-MEM. As placas foram então colocadas em uma estufa a 37°C para aquecer o meio. A seguir, o número de células viável/clone foi determinado com Trypan Blue e as células, após previa diluição (1:60) foram contadas em câmara de Neubauer. O número obtido foi então utilizado para determinar o volume de meio a ser adicionado a 10 μ l de células de forma a obter uma diluição tal que só haja uma célula para cada 100 μ l de meio. Após apropriada diluição, transferiu-se 100 μ l da suspensão celular para cada poço da placa de microtitulação. A segunda placa foi utilizada com uma diluição 1:2 da suspensão celular, esperando-se assim 0.5 células por 100 μ l. Após 15 dias em cultura, coletou-se os sobrenadantes. Os mesmos foram ensaiados por ELISA conforme acima descrito e foram selecionados 2 clones com alto título para uma adicional subclonagem, de forma a assegurar que os anticorpos obtidos eram de fato provenientes de uma única população de células.

3.8 Caracterização dos anticorpos monoclonais:

3.8.1 Isotipagem

As imunoglobulinas produzidas pelas células subclonadas foram ensaiadas por ressonância plasmônica de superfície para determinar seu isotipo. Para tal, utilizou-se um kit de isotipagem Biacore. Em uma primeira etapa, imobilizou-se uma IgG anti-IgG de camundongo específica para a região Fc γ . Esta IgG foi utilizada para capturar os monoclonais cuja subclasse se queria determinar. A seguir foram injetados sequencialmente os anticorpos específicos para cada isotipo. Aquele que se ligasse à IgG capturada possibilitaria identificar a subclasse da mesma.

3.8.2 Western blot:

Uma amostra de BthTx-1 (200 μ g) foi aplicada em um gel (NOVEX) a 10% em tris-tricina. Finda a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,22 μ) do mesmo fabricante⁶⁵. A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em tampão tris/salina pH 8.3 por uma hora. Os Sobrenadantes dos clones (80 μ l diluídos 1:10 em tris-salina) foram então incubados "over night" . Após 4 lavagens com tris-salina, a membrana foi incubada por 90 minutos com IgG de carneiro anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase. Depois de 4 lavagens, a reação foi revelada pela adição de substrato/cromógeno TMB (Kirkgaard & Perry laboratories).

3.8.3 Determinação da afinidade dos anticorpos:

Em um chip CM-5 (Biacore AB) , acoplou-se IgG de coelho anti-IgG de camundongo. Após bloquear os sítios aminoreativos remanescentes com etanolamina, injetou-se o monoclonal a ser testado, ficando este ligado por sua porção Fc. Procedeu-se então a injeção da toxina nativa ou irradiada, ficando esta ligada aos anticorpos. Ao contrario do que ocorre com antígenos ensaiados por western-blot, neste ensaio o antígeno não sofre nenhum tipo de denaturação, constituindo assim um ensaio de ligação em solução com a toxina apresentando seus epitopos conformacionais ⁶⁴. Foram injetados 20 µl de solução por corrida. Cabe ressaltar que ainda não se teve êxito em produzir todos os anticorpos em fluído ascítico. Assim, testou-se os sobrenadantes de cultura de que se dispunha sem nenhuma purificação prévia. Em função disto, não se pôde determinar a concentração de IgG presente no material injetado. A determinação da afinidade de anticorpos pela técnica que foi utilizada normalmente requer que as imunoglobulinas purificadas sejam analisadas em concentrações conhecidas. Desta forma, não foi possível calcular o Kd em termos molares. O que se analisou foi a dissociação do complexo antígeno-anticorpo por 60 segundos. Deste modo, contornou-se o problema da diferença de concentração de IgG entre as diversas amostras. Os resultados foram analisados pelo software do aparelho (Biacore) e expressos como Kd em função do tempo.

4. Resultados

4.1 Purificação da *bothropstoxina-1*:

A cromatografia do veneno total resultou em três picos (figura 4). O primeiro eluiu antes de se iniciar o gradiente e constitui a fração não adsorvida. O segundo pico foi detectado com uma concentração de NaCl de 420 mM e corresponde à *bothropstoxina-1*. Um terceiro pico foi observado eluindo com 560 mM de sal. Dados preliminares indicam que esta última fração tem atividade fosfolipase A2 e um peso molecular em torno de 14 kDa.

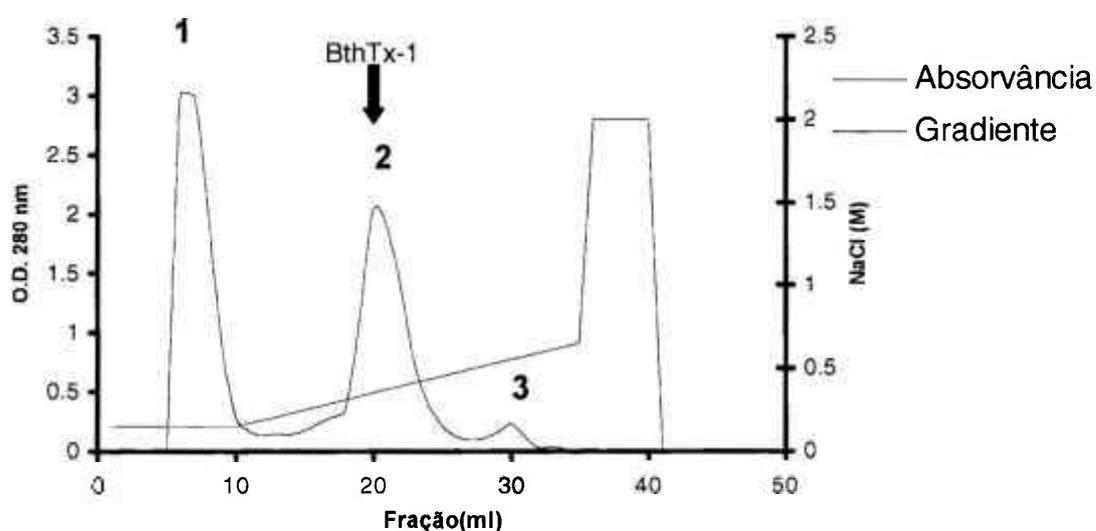


Figura 4 : Perfil cromatográfico de 25 mg de veneno total em uma coluna Resource S (Amersham Pharmacia Biotech). Tampão A : fosfato de sódio 25 mM pH 7.8. Tampão B: fosfato de sódio 25 mM / NaCl 2 M pH 7.8. Fluxo: 2.5 ml/minuto. Volume coletado: 1 ml/tubo.

4.2 Determinação da pureza:

4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

A fração purificada apresentou uma única banda com peso molecular em torno de 14 kDa (figura 5) compatível com aquele descrito para a bothropstoxina-1¹⁴. No entanto, foram descritas outros componentes do veneno de *B. jararacussu* com peso molecular próximo³³, razão pela qual se optou por confirmar a identidade do material purificado por sequenciamento N-terminal.

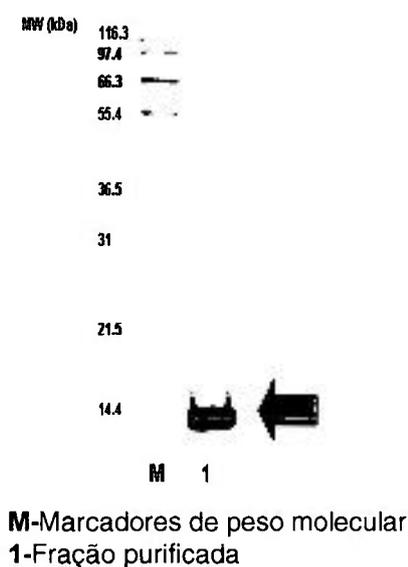


Figura 5 : SDS-PAGE da fração purificada em um gel de poliacrilamida na presença de β mercaptoetanol.

4.2.2 Seqüenciamento N-terminal:

A seqüência obtida foi S-L-F-E-L, correspondendo a aquela descrita na literatura para a bothropstoxina-1 confirmando assim a identidade do material purificado.

4.3 Irradiação das amostras

Não se observou nenhum tipo de material insolúvel após a irradiação.

4.4 Análise das alterações estruturais:

4.4.1 Espectrometria de massa

4.4.1.1-LC/ESI-MS

A análise da amostra nativa por eletrospray aponta para uma alta pureza do material (figura 6) , validando o método de purificação utilizado. Calculando-se a massa a partir do algoritmo descrito, temos:

$$m_1 = m/z_1 \ 1247.0$$

$$m_2 = m/z_2 \ 1371.5$$

$$m_a = 1$$

De posse desses valores n_2 e M podem ser calculados:

$$N_2 = \frac{(m_1 - m_a)}{(m_2 - m_1)}$$

$$\text{Com } m_1 = 1247.0$$

$$\text{e } m_2 - m_1 = 1371.5 - 1247.0 = 124.5$$

$$\text{temos } n_2 = 10$$

$$\text{sendo } M = n_2 (m_2 - m_a) \text{ obtém-se } M = 13705$$

Para a amostra irradiada com 2000 Gy, o espectro obtido é muito mais complexo (figura 7) , indicando a presença de varias formas da toxina.

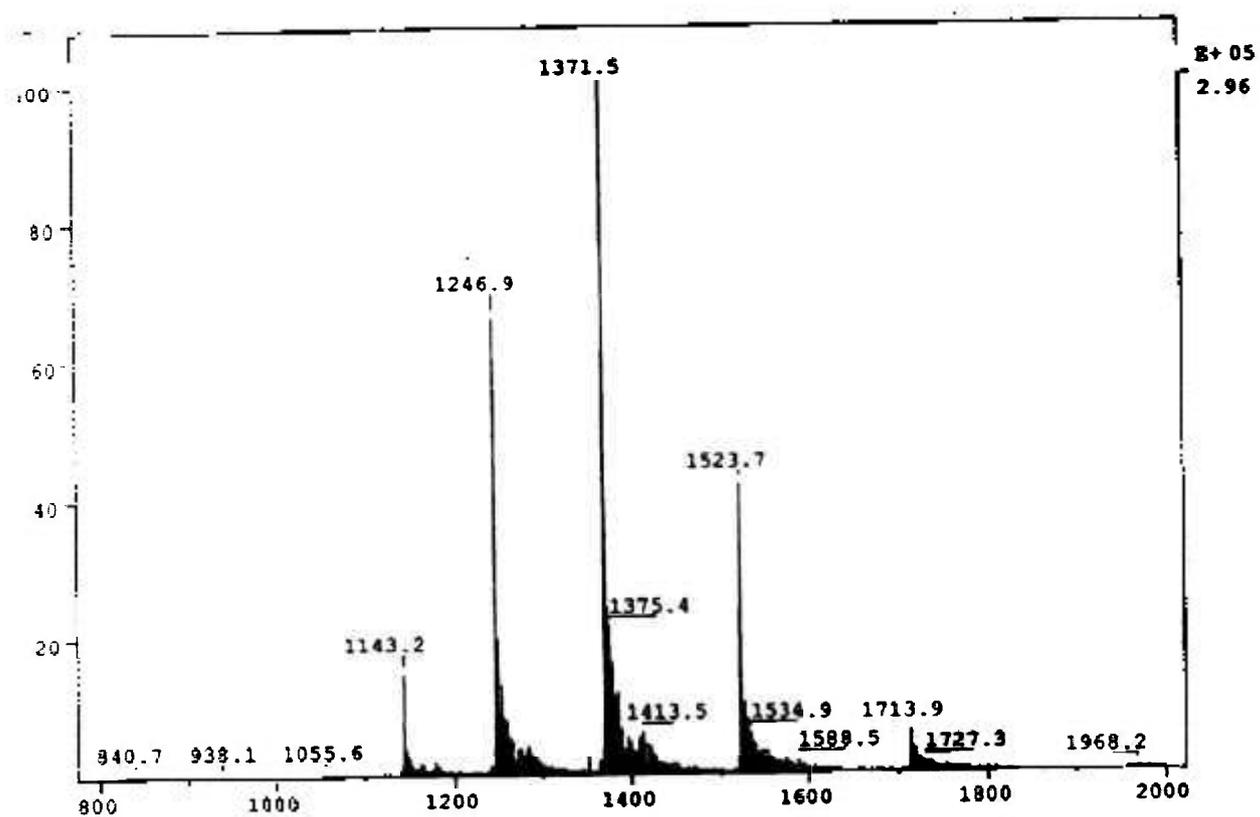


Figura 6: espectro de massa da toxina nativa

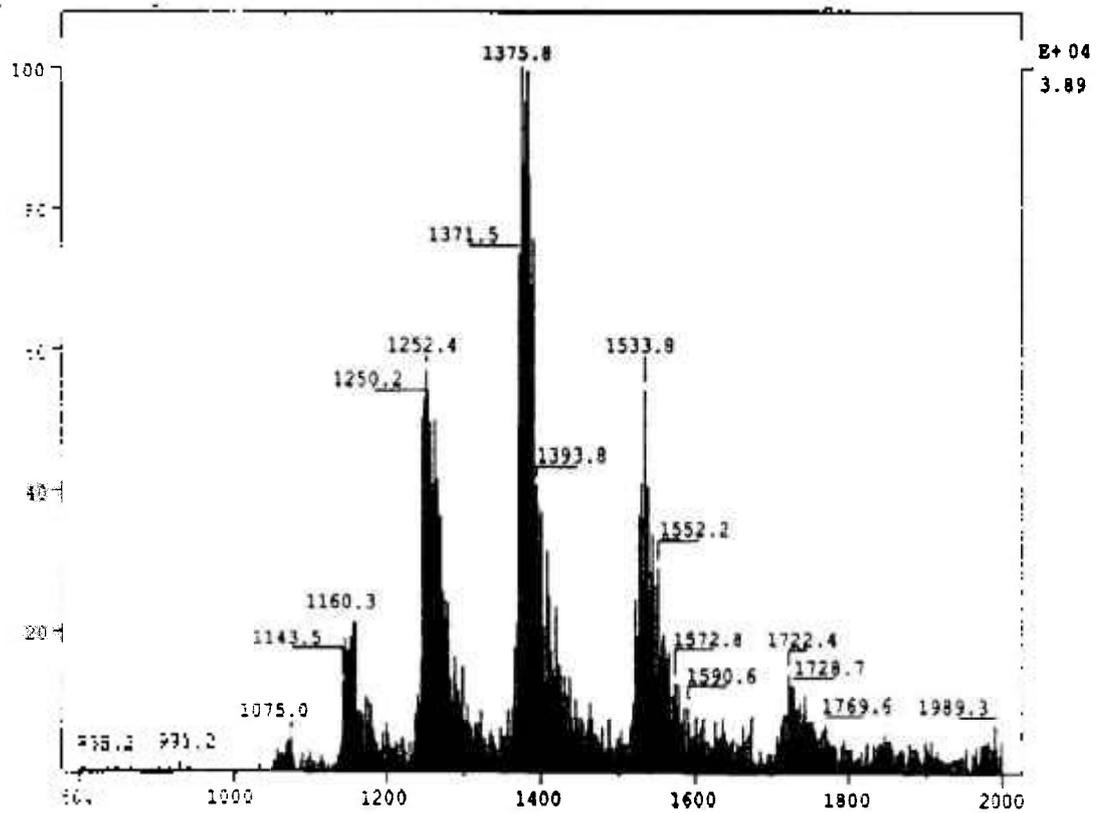


Figura 7: espectro de massa da toxina irradiada com 2000 Gy

4.4.1.2-MALDI-TOF

Conforme acima citado, a resolução deste aparelho é menor. Este fato é exemplificado pelo espectro da toxina nativa (figura 8). A toxina pode ser detectada na sua forma monomérica com cargas +3, +2 e +1. Aparecem também a bothropstoxina-1 na sua forma dimérica (M=27388,58), o trímero (M=411157,65) o trímero com carga +2 (M/z=20567,2) e o tetrâmero com carga +1 (M= 54833,92).

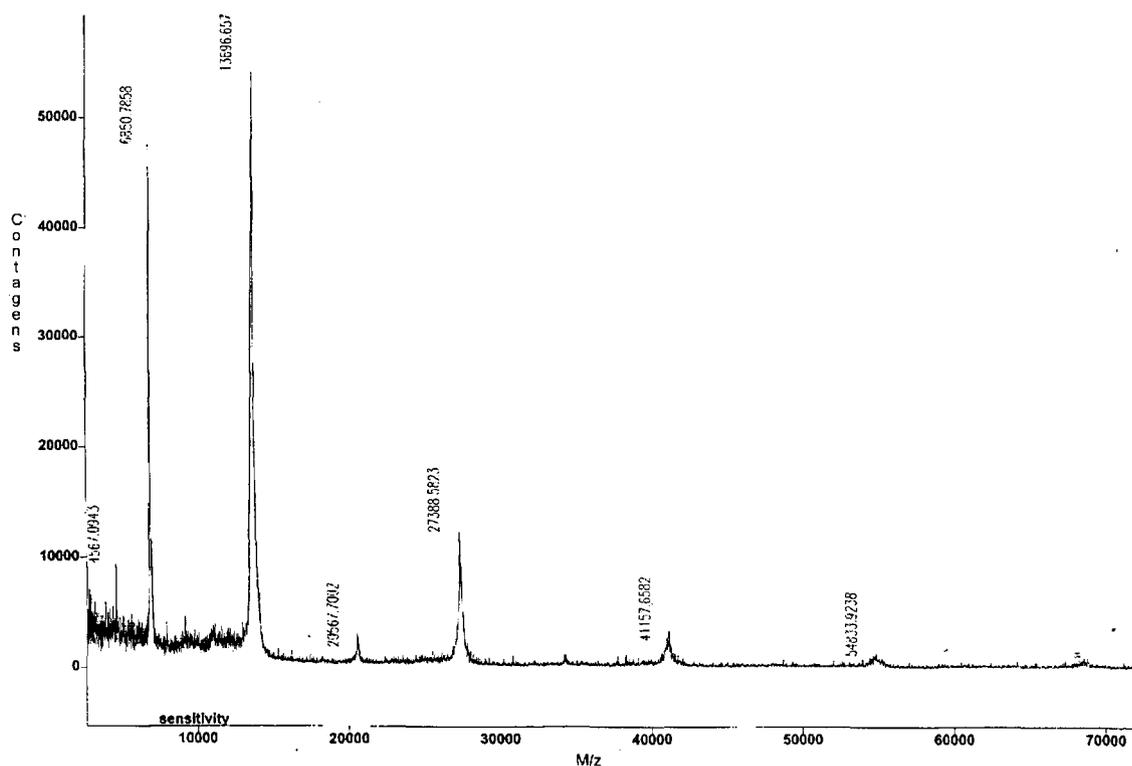


Figura 8: espectro MALDI-TOF da toxina nativa.

Para a amostra irradiada com 500 Gy (figura 9), considerando a janela de detecção utilizada, podemos ver o monômero da bothropstoxina-1 com carga +2 ($M/z=6874,43$) e +1 ($M=13744,36$). O dímero e as outras formas não foram detectadas.

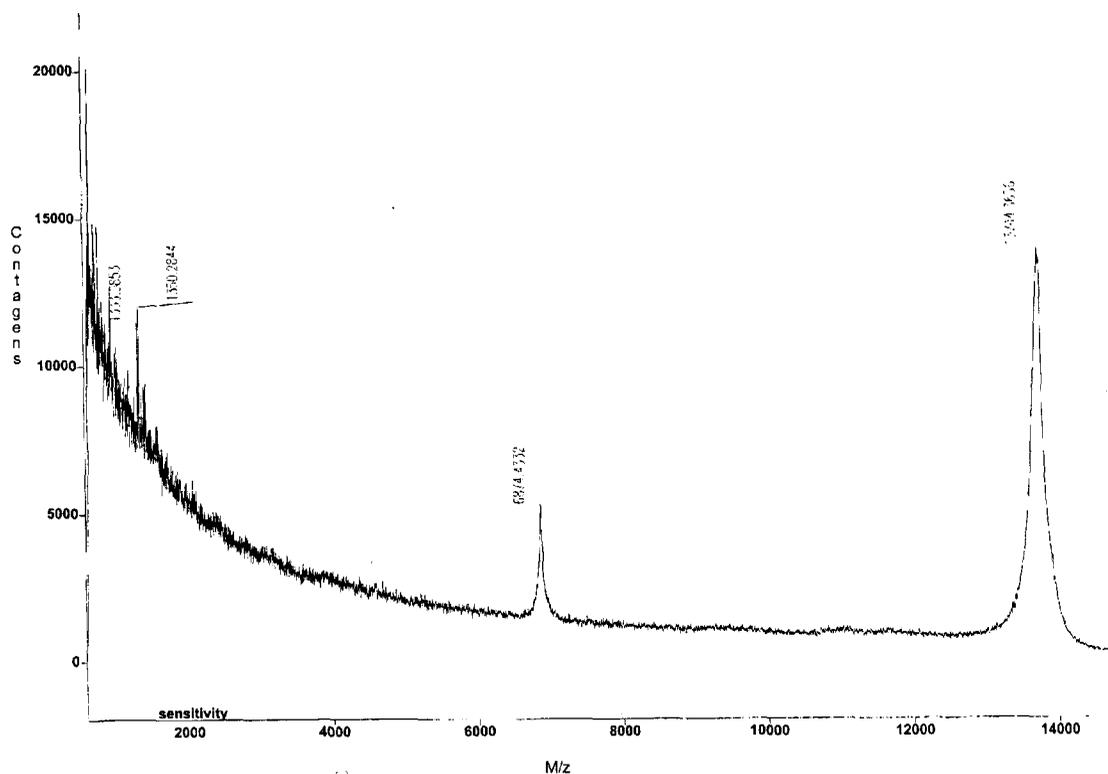


Figura 9: espectro MALDI-TOF da toxina irradiada com 500 Gy.

Para a amostra irradiada com 1000 Gy (figura 10), Mais uma vez, são detectados os monômeros com cargas +2 e +1.

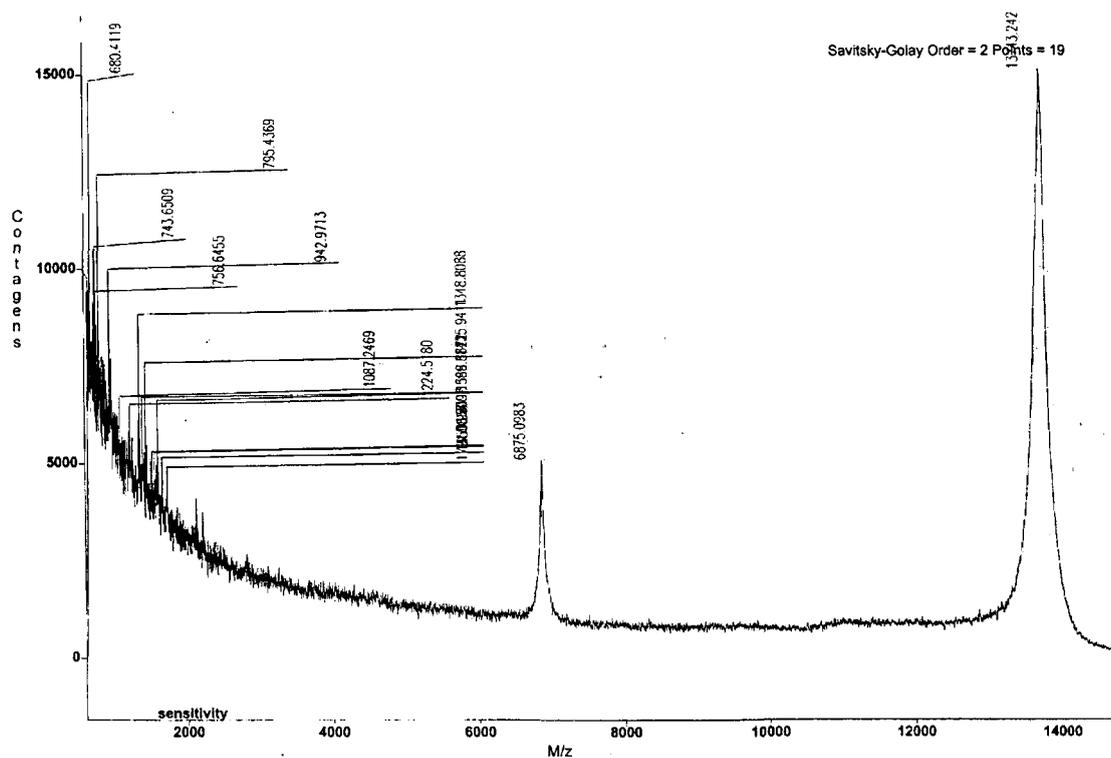


Figura 10: espectro MALDI-TOF da toxina irradiada com 1000 Gy.

O espectro da toxina irradiada com 2000 Gy (figura 11) é um pouco mais complexo de ser analisado. Na porção esquerda do gráfico são vistos picos cujas razões carga/massa não correspondem à proteína de interesse. Não foi possível determinar se tais picos correspondem a fragmentos da toxina ou a modificações na estrutura primária da proteína (desaminação, oxidações), acarretando diferenças de massa. Na posição correspondente ao pico da proteína com carga +1 (em torno de 13700) podemos ver um pequeno pico, que corresponde à toxina íntegra.

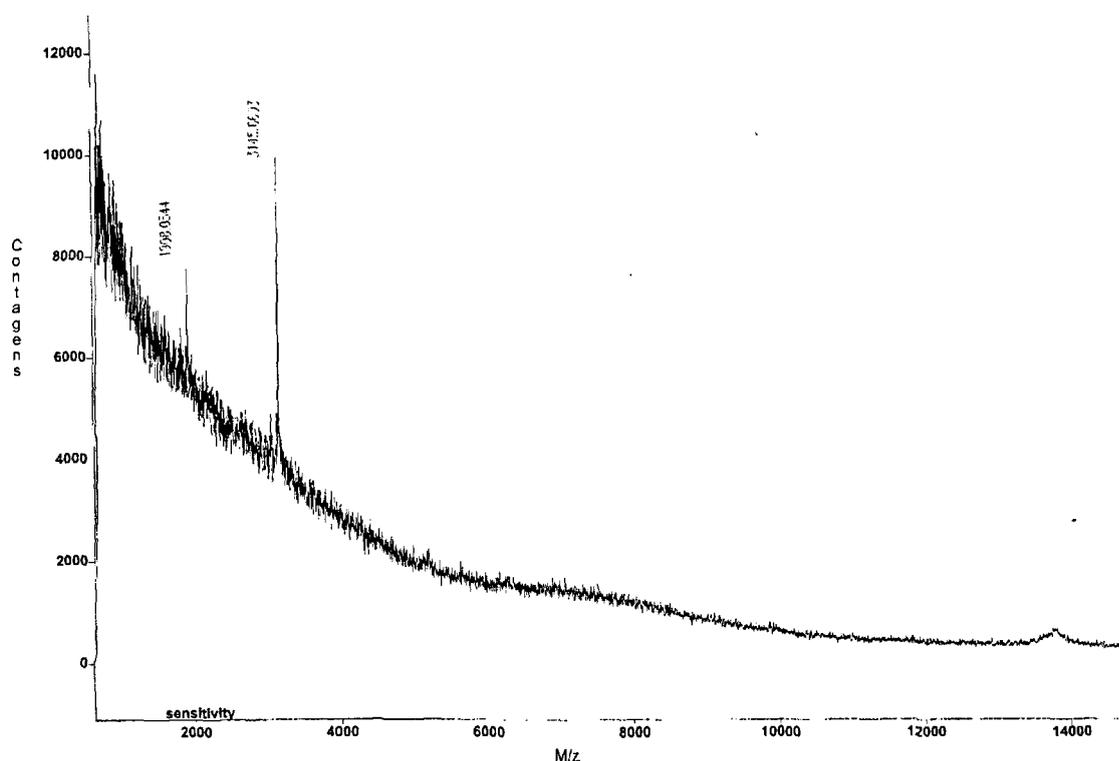


Figura 11: espectro MALDI-TOF da toxina irradiada com 2000 Gy.

4.4.2 Dicroísmo circular

Ao compararmos os espectros da BthTx-1 nativa e irradiada com a dose de 500 Gy (figura 12), nenhuma diferença significativa é observada, mostrando ser esta dose insuficiente para promover alterações estruturais detectáveis por esta técnica.

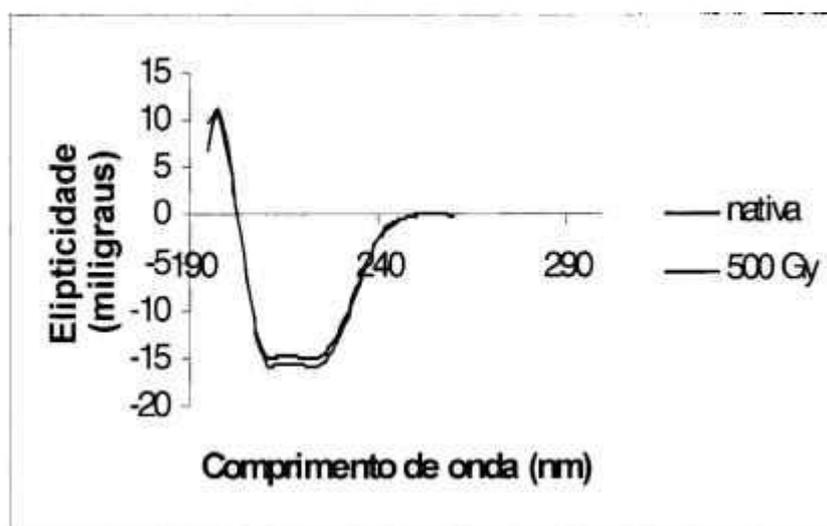


Figura 12: espectro CD da toxina nativa e irradiada com 500 Gy.

Quando a toxina é irradiada com 1000 Gy (figura 13), ocorre significativa perda de sinal apontando para uma perda de elementos estruturais.

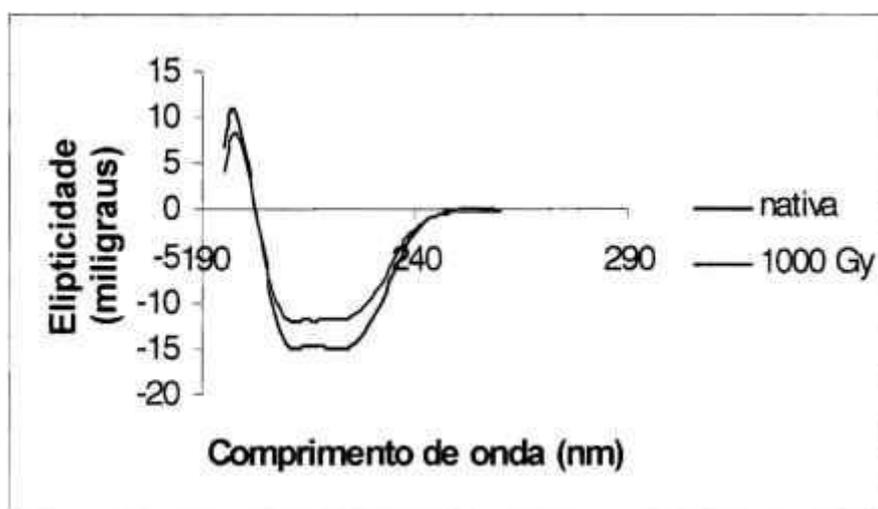


Figura 13: espectro CD da toxina nativa e irradiada com 1000 Gy.

A diminuição de sinal observada para a amostra irradiada com 1000 Gy é novamente observada para a amostra irradiada com 2000 Gy (figura 14). Ao compararmos os espectros obtidos para a toxina irradiada com 1000 e 2000 Gy, observa-se que os espectros são muito semelhantes.

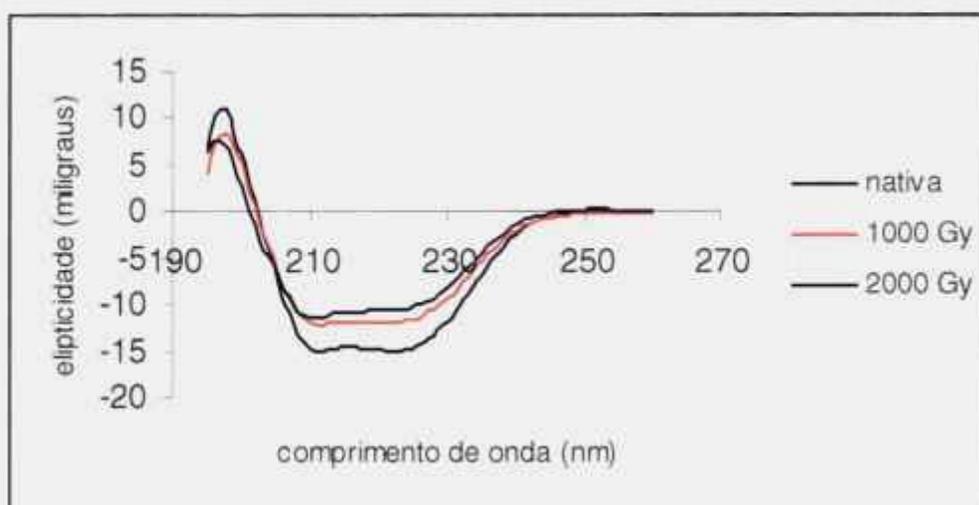


Figura 14: Espectro CD da toxina nativa e irradiada com 1000 ou 2000 Gy.

Ward *et al.*⁶⁷ Atribuem às miotoxinas uma estrutura bastante rígida, estabilizada pelas 7 pontes dissulfeto que a molécula encerra. Em vista deste fato, resolvemos averiguar o papel destas pontes na estabilidade conformacional da toxina irradiada com 2000 Gy. Para tal, determinou-se o espectro CD da toxina nativa ou irradiada na dose acima na presença de β -mercaptoetanol.

Pode-se observar abaixo (figura 15) que a redução das pontes S-S na toxina nativa resultou em uma diminuição da elipticidade.

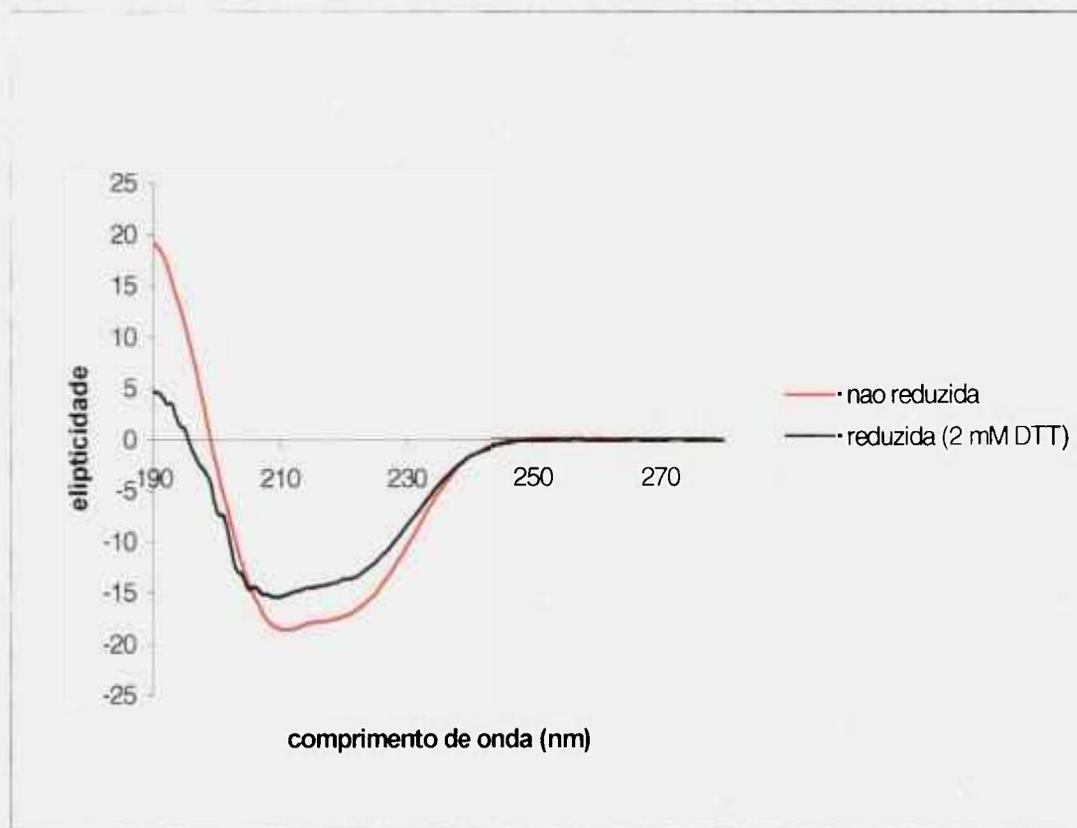


Figura 15 : efeito da redução das pontes dissulfeto na estrutura secundária da bothropstoxina-1 nativa.

Para a toxina irradiada com 2000 Gy, a alteração no padrão de elipticidade foi ainda mais drástica (figura 16).

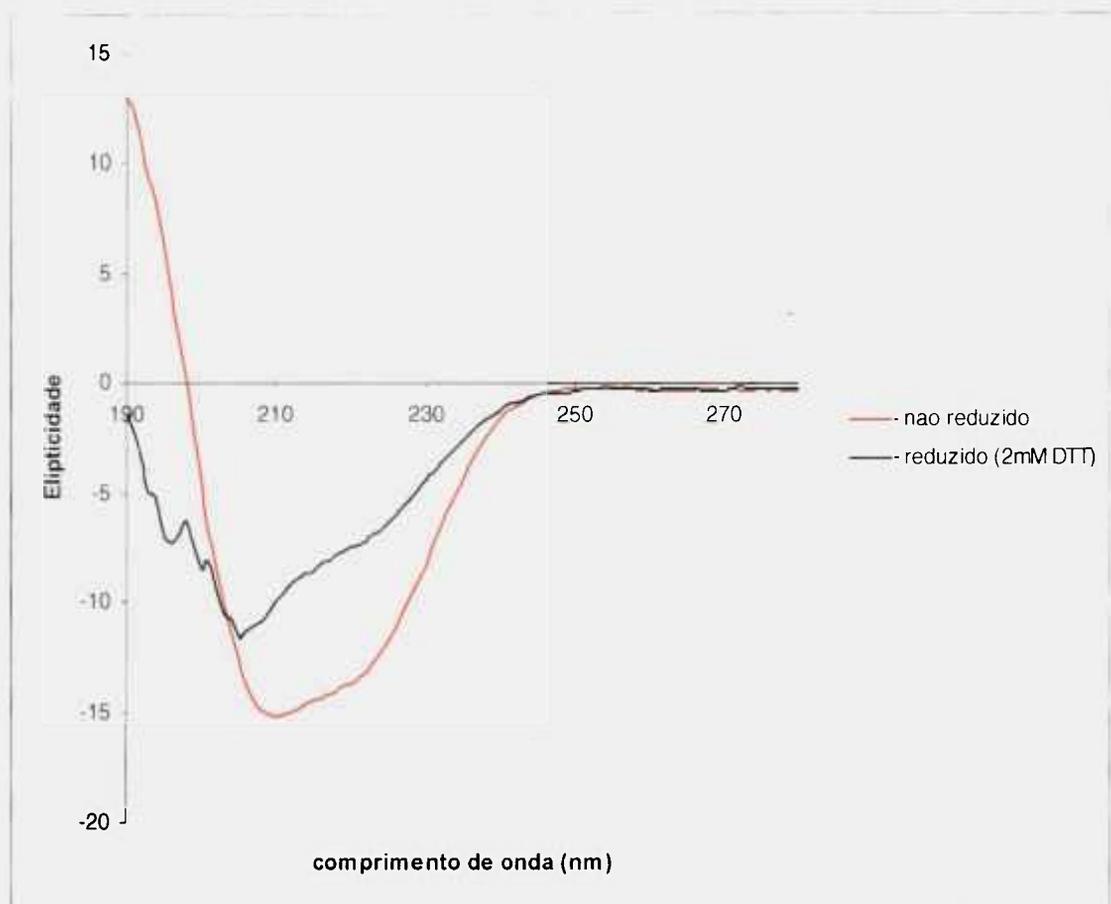


Figura 16: efeito da redução das pontes dissulfeto na estrutura secundária da bothropstoxina-1 irradiada com 2000 Gy.

4.4.3 Denaturação térmica

Conforme descrito em materiais e métodos, a amostra foi ensaiada em dois pHs, 7 e 4. O intuito deste procedimento era testar a estabilidade e solubilidade da proteína nestas duas condições durante o processo de aquecimento. A amostra diluída em tampão fosfato precipitou durante o ensaio, mostrando-se esta condição inviável para a análise. Tal fato não se repetiu para a amostra em pH 4. Sendo assim, optou-se por proceder à análise em tampão acetato. As amostras irradiadas com 1000 e 2000 Gy apresentam um sinal bem menor no comprimento de onda utilizado (222 nm), apontando para um decréscimo na quantidade de alfa-hélice quando comparadas com a toxina nativa e irradiada com 500 Gy (figura 17).

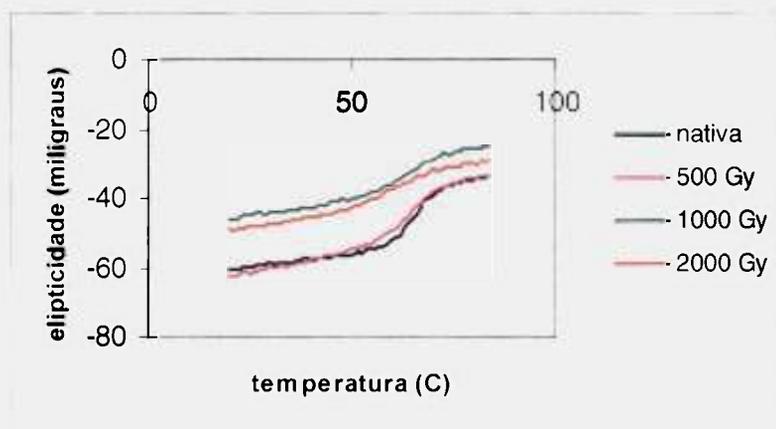


Figura 17: elipticidade da toxina nativa ou irradiada a 222 nm.

Observa-se também que não houve diferenças significativas entre o ponto de fusão da toxina nativa e aquele das toxinas irradiadas (tabela 4).

A entalpia de Vant'Hoff (ΔH_{vh}) apresentou-se diferente, sendo significativamente menor nas amostras irradiadas. A transição entre o estado nativo e denaturado ocorreu numa faixa de temperatura muito menor para toxina nativa do que para as toxinas irradiadas. Também pode se notar que o deslocamento do equilíbrio nativo \leftrightarrow denaturado iniciou-se em uma temperatura menor para a BthTx-1 irradiada.

Tabela 4: Ponto de fusão e entalpia de Vant'Hoff da BthTx-1 antes e após a irradiação.

Amostra	Ponto de fusão (°C)	ΔH (kcal/mol)
Nativa	$65.6 \pm 0,5$	75
500 Gy	$64,7 \pm 0,5$	60
1000 Gy	$65.6 \pm 0,5$	43
2000 Gy	$62,5 \pm 0,5$	32

4.4.4 Recromatografia da toxina irradiada

Conforme pode ser visto no perfil de eluição da toxina irradiada (figura 18), A irradiação com 2000 Gy promoveu o aparecimento de uma forma de maior peso molecular. No entanto, devido a faixa de resolução da resina utilizada, não foi possível separar totalmente as duas formas da toxina, razão pela qual optou-se por selecionar os tubos 36 e 42 onde as formas de maior e menor peso molecular ocorrem de forma predominante.

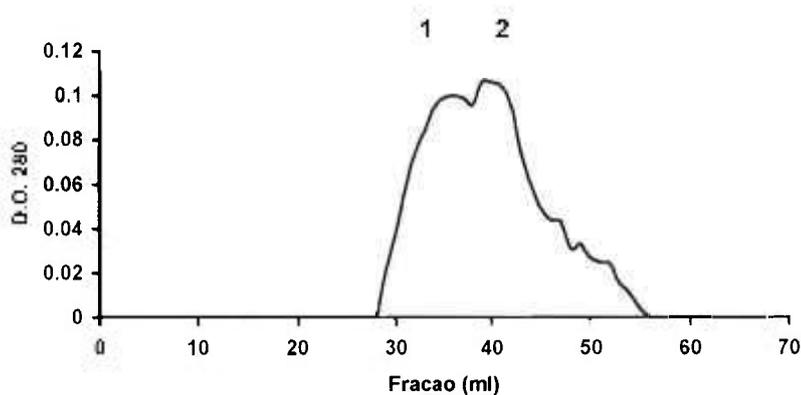


Figura 18: perfil de eluição da BthTx-1 irradiada com 2000 Gy em Sephacryl S-200 HR

4.4.5 Fluorescência

Os dados brutos da fluorescência foram processados de forma a determinar as constantes de supressão de Stern-Volmer (coeficiente angular da reta $[(f_0/f)-1] \times$ concentração de acrilamida). Tais constantes refletem diretamente a exposição do fluoróforo ao solvente. Desta forma, quanto menor a constante de Stern-Volmer, menor a exposição do triptofano 77 ao solvente. Para a amostra nativa, observa-se um comportamento bifásico (figura 19) que pode ser atribuído a um equilíbrio entre a forma monomérica da toxina (alta constante de Stern-Volmer) e a forma dimérica (baixa constante). Já para a amostra do tubo 36, observa-se um comportamento monofásico com uma constante de supressão que sugere predomínio da forma dimérica. Para a amostra do tubo 42, a constante se apresenta mais alta, apontando para uma maior exposição do triptofano 77.

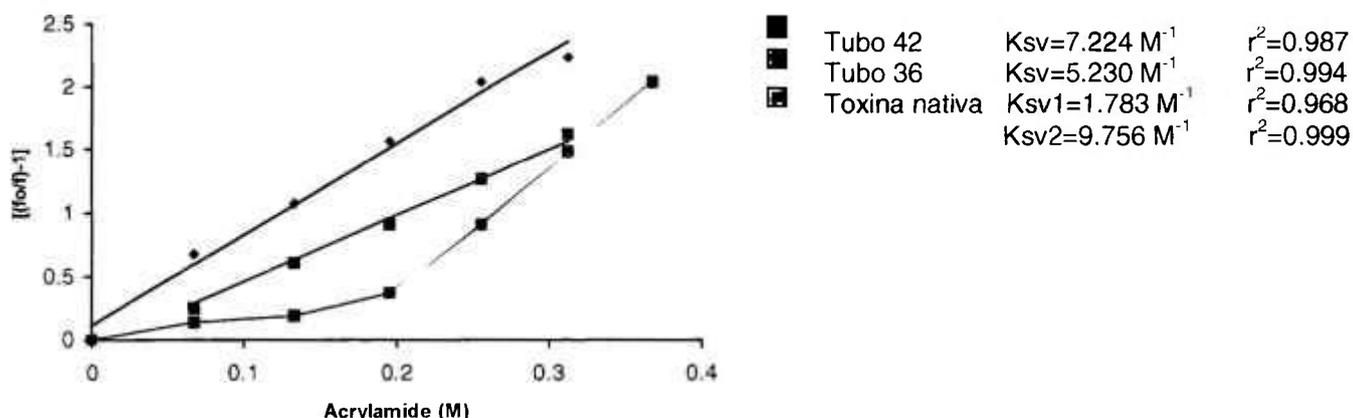


Figura 19: supressão da fluorescência do triptofano 77 por concentrações crescentes de acrilamida.

Foi então investigado se esta alteração da estrutura quaternária ocorria em um padrão dose-dependente. Para tal, analisamos o espectro de emissão da bothropstoxina-1 nativa e irradiada com 500, 1000 e 2000 Gy. Neste ensaio, ao invés de utilizarmos acrilamida para avaliar a exposição do fluoróforo ao solvente, baseamo-nos na atenuação da fluorescência decorrente das colisões das moléculas de água com o grupamento aromático. Ao expormos o anel aromático, o rendimento quântico diminui em função da acessibilidade deste ao solvente e da maior probabilidade de colisões de moléculas do solvente com o anel aromático. A análise foi realizada em pH 7 e 5 para investigarmos também o efeito do pH na estrutura quaternária da bothropstoxina.

Abaixo vemos o espectro de fluorescência da BthTx-1 nativa ou irradiada em pH 5 (figura 20) e 7 (figura 21).

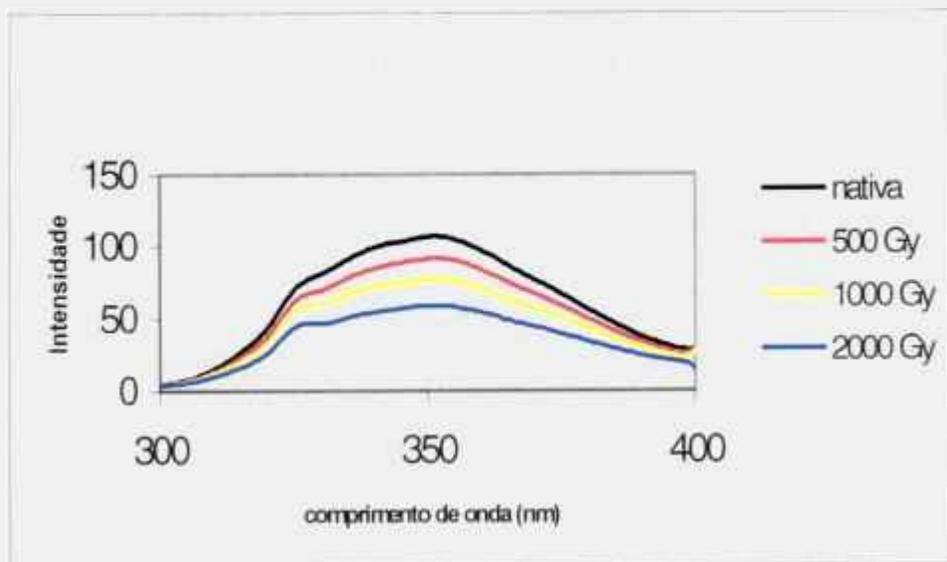


Figura 20: espectro de fluorescência em pH 5 da toxina nativa e irradiada.

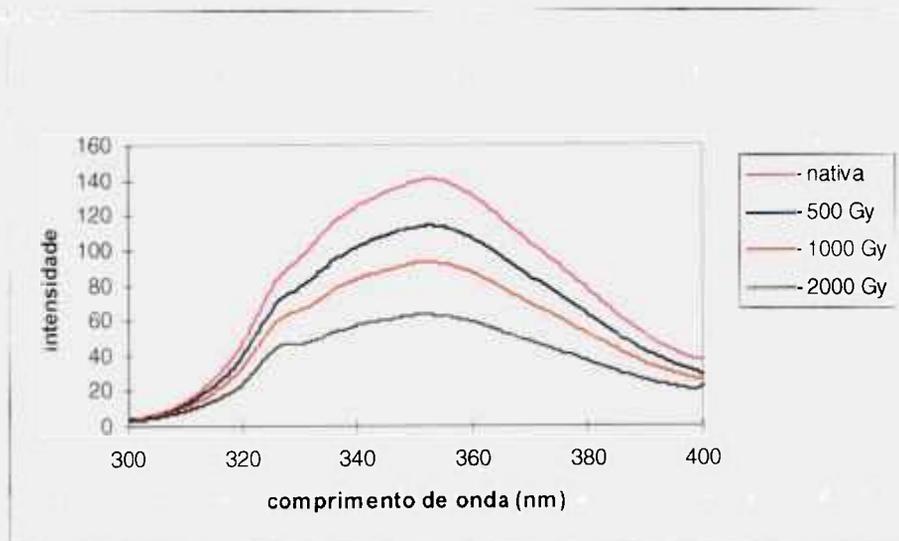


Figura 21: espectro de fluorescência em pH 7 da toxina nativa e irradiada.

Estes dados mostram que a irradiação leva a uma gradual exposição do triptofano 77 em um padrão dose dependente. Observa-se também que o rendimento quântico das amostras ensaiadas em pH 5 é ligeiramente menor do que aquele que se obtém em pH 7. O papel das pontes dissulfeto na estrutura quaternária da bothropstoxina também foi investigado por esta técnica. Após redução das ligações S-S pela adição de DTT, mediram-se os espectros de emissão das amostras nativas e irradiadas (figura 22).

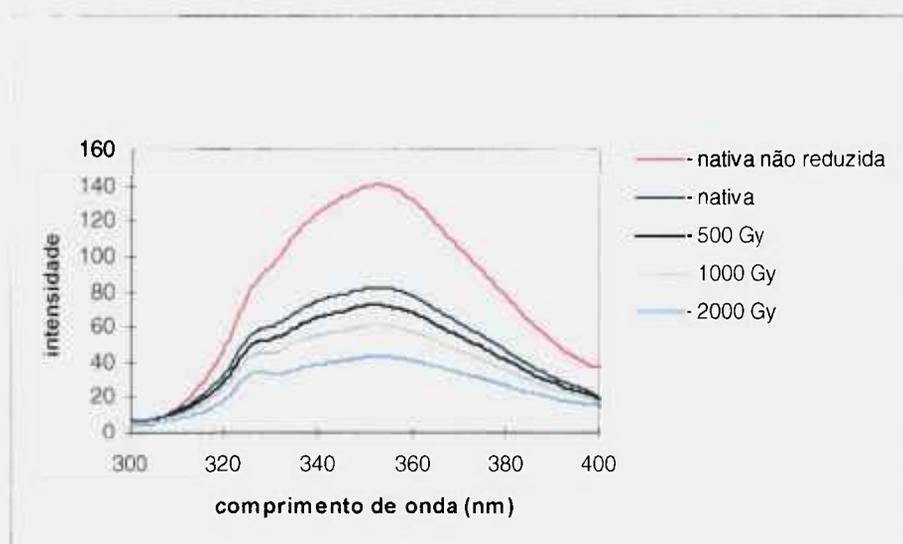


Figura 22: Espectro de emissão da BthTx-1 em pH 7 após redução de suas pontes dissulfeto.

O espectro acima mostra que a redução das 7 pontes S-S na toxina nativa acarreta uma exposição maior do triptofano 77. Ainda na mesma figura, podemos ver que o rendimento quântico diminui em função da dose de radiação. Assim, mesmo após a redução das pontes dissulfeto que conferem rigidez à BthTx-1 o triptofano se encontra em uma região cuja acessibilidade ao solvente depende da dose de radiação a que a toxina foi submetida.

4.5 Produção de anticorpos monoclonais

Uma semana após a primeira imunização, todos os animais foram anestesiados e sangrados pelo plexo retro-orbital para titulação de IgG anti-bothropstoxina-1 . Todos os animais apresentaram títulos entre 1:6400 e 1:12800. Entretanto, não foi possível realizar sangrias subsequentes para acompanhar a cinética de produção de IgG.

Após a fusão com células de mieloma, iniciou-se uma varredura por ensaio imunoenzimático nos 2000 clones obtidos para identificar os clones positivos. Foram considerados positivos todos os clones cujo sobrenadante apresentasse uma densidade óptica igual ou maior que 0,5 . Uma vez selecionados, estes clones foram transferidos para placas de 24 poços e reensaiados .

Na primeira varredura foram obtidos 40 clones positivos para os animais imunizados com toxina nativa e 201 clones positivos para os animais imunizados com a toxina irradiada. Na segunda varredura, estes números diminuíram (19 clones positivos para a toxina nativa e 134 para a toxina irradiada). Esta diminuição no número de clones positivos pode ser atribuída a falsos positivos na primeira varredura ou a instabilidade de alguns dos clones.

4.5.1 Análise dos clones positivos por ressonância plasmônica de superfície

Os clones positivos no ensaio imunoenzimático foram ensaiados por esta técnica. Neste ensaio, adsorve-se o ligante a um “chip” previamente condicionado para acoplamento de grupos amina. A seguir, injetaram-se 5 µl da solução a ser ensaiada. Finda a injeção, pôde-se avaliar a quantidade de material ligado pela diferença entre a leitura (em unidades de ressonância ou UR) após o término da injeção e a leitura inicial (linha base). Segue abaixo um sensograma típico deste tipo de ensaio (figura 23).

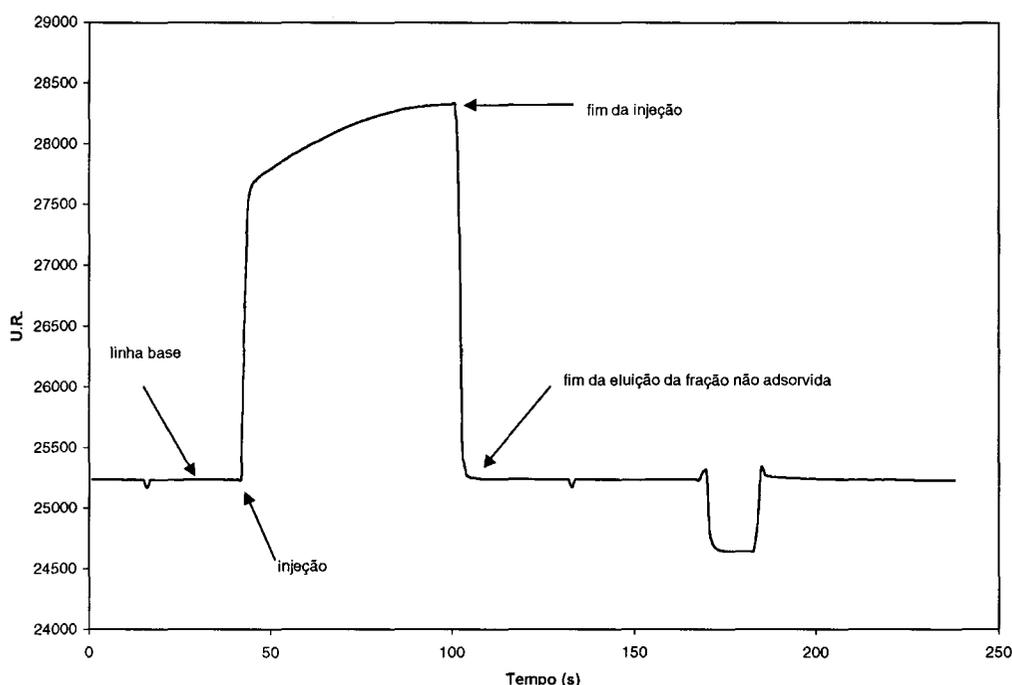


Figura 23: Sensograma típico de um ensaio de ressonância plasmônica de superfície.

A caracterização dos anticorpos por esta metodologia permitiu diminuir mais ainda a quantidade de candidatos a subclonagem. No entanto ainda se corria o risco de estar selecionando anticorpos com afinidade pelos mesmos epitopos. Assim, se procurou caracterizar os anticorpos por ensaios de competição pelo antígeno, visando identificar aqueles direcionados contra epitopos diferentes. A reinjeção do mesmo anticorpo utilizado para capturar a toxina no “chip” promoveu um aumento na ressonância, mostrando que a BthTx-1 ocorre na forma dimérica também em solução. Quando estes anticorpos foram ensaiados para avaliar a sua capacidade de discriminar entre a toxina nativa e aquela irradiada com 2000 Gy, obtiveram-se os seguintes padrões de reatividade (tabela 5):

Tabela 5 : ligação dos anticorpos monoclonais à BthTx-1 nativa ou irradiada com 2000 Gy.

Clone	Unidades de ressonância (amostra nativa)	Unidades de ressonância (amostra irradiada)
I4E7	17	601
I1G6	2302	756
I2C12	1884	195
I4B12	1795	858
I7C9	1426	770
I2H5	202	703
I2E12	79	465
I6D12	910	365
I8E9	2014	1508
I10A4	1015	1361
I7D12	44	1294
I7D6	1129	819
I3H11	1000	696
N9H6	1391	1201
N5C9	1900	1742
N6F11	358	248

Construindo-se um histograma a partir dos dados acima, adotando-se a maior ressonância como correspondendo a 100% de ligação, obtém-se o seguinte gráfico (figura 24):

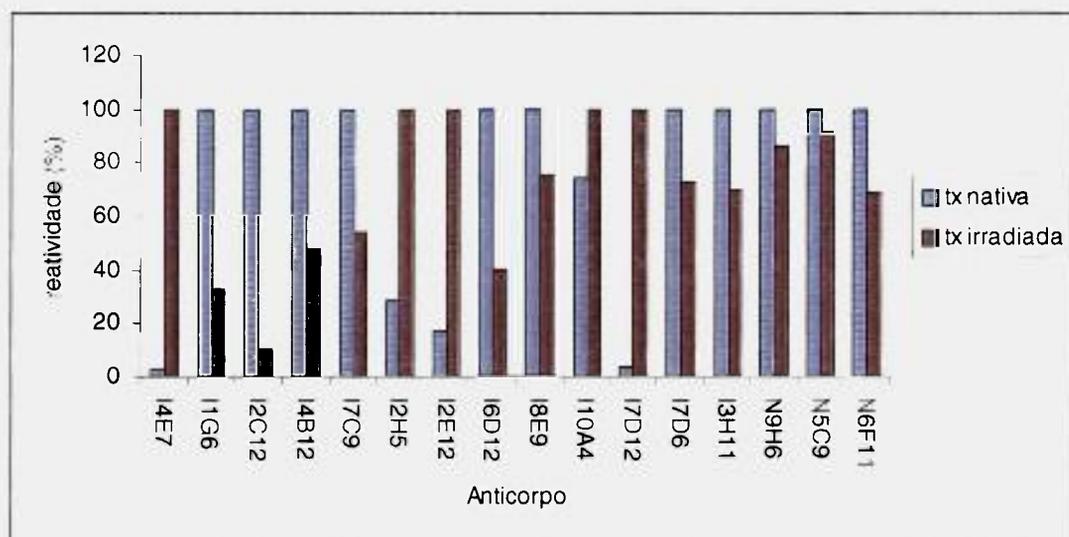


Figura 24 : reatividade dos anticorpos frente à toxina nativa ou irradiada com 2000 Gy. Para fins de comparação, considerou-se a reação antígeno-anticorpo que resultasse na maior ressonância como correspondendo a 100% de ligação.

Deste gráfico, pode se perceber que alguns monoclonais apresentam maior reatividade frente à toxina nativa (I1G6, I2C12, I4B12 I7C9 e I6D12), enquanto outros parecem se ligar preferencialmente à toxina irradiada (I4E7, I2H5, I2E12 e I7D12). Um terceiro grupo de anticorpos apresenta reatividade frente as duas formas do antígeno (I8E9, I10A4, I7D6 I3H11, N9H6, N5C9 e N6F11).

4.5.2 Isotipagem

Após a segunda subclonagem, os anticorpos produzidos foram caracterizados por ressonância plasmônica, visando-se investigar a que subclasse de IgG os mesmos pertenciam. Um sensograma representativo deste tipo de ensaio está exemplificado abaixo (figura 25).

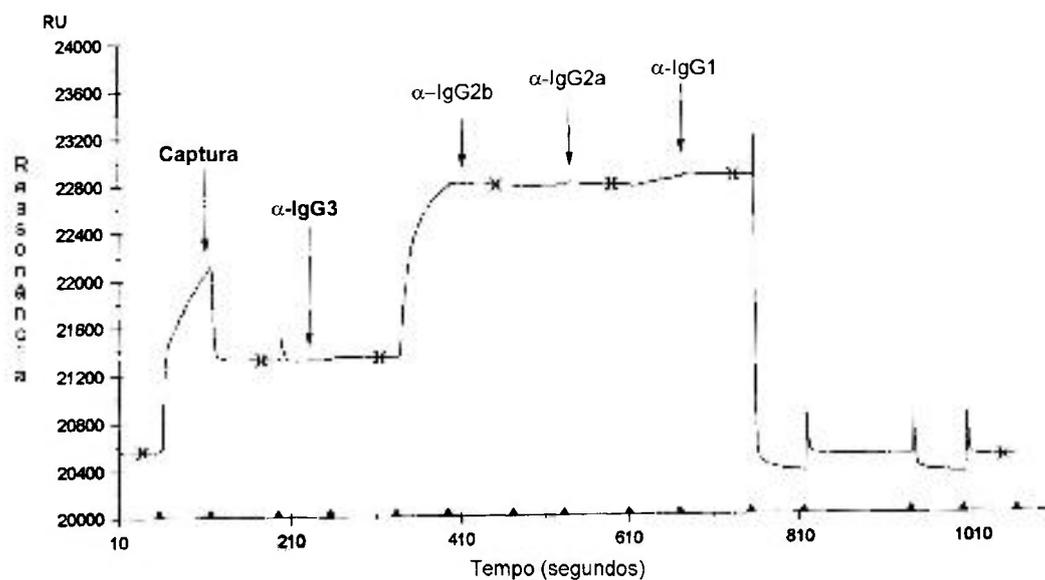


Figura 25: isotipagem do anticorpo monoclonal I4E7. As setas representam os pontos de injeção do anticorpo a ser analisado e dos anticorpos anti-IgG3, IgG2b, IgG2a e IgG1.

Observa-se que todos os anticorpos caracterizados são IgG1 ou IgG2b (tabela 6) .

Clone	Isotipo
I4E7	IgG2b
I1G6	n.d.
I2C12	n.d.
I4B12	IgG1
I7C9	IgG1
I2H5	IgG1
I2E12	IgG2b
I6D12	IgG1
I8E9	IgG1
I10A4	IgG1
I7D12	IgG2b

Tabela 6 : classificação dos monoclonais por isotipo. n. d. : não determinado.

4.5.3 Western Blot

De acordo com o nosso experimento (figura 26), a maioria dos monoclonais reconheceu o antígeno denaturado, denotando afinidade por epítopos lineares. É interessante notar que as formas multiméricas da toxina detectadas por MALDI-TOF também foram observadas neste ensaio.

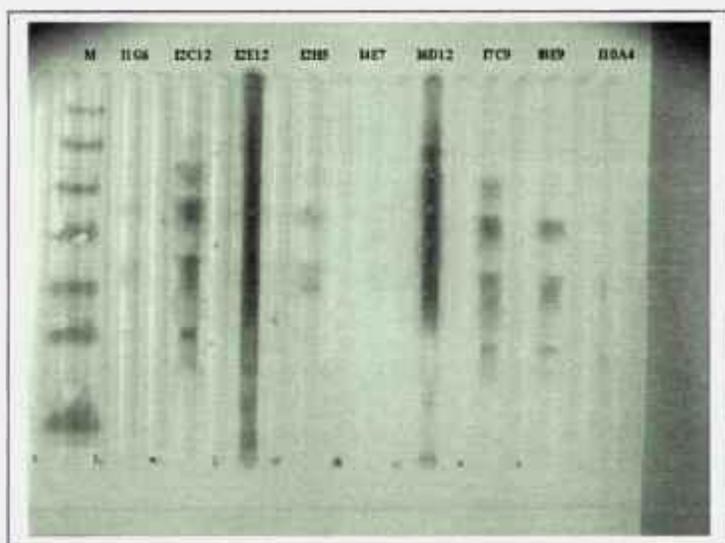


Figura 26: análise dos anticorpos monoclonais por Western-blot. M: marcadores de peso molecular (NOVEX Seebue).

4.5.4 Determinação da afinidade dos anticorpos

Na tabela abaixo (tabela 7) apresentam-se os padrões de dissociação dos anticorpos até agora testados contra a toxina nativa ou irradiada com 2000 Gy.

Tabela 7: comparação das constantes de dissociação dos anticorpos frente à toxina nativa ou irradiada com 2000 Gy.

Clone	Kd (1/s) nativa	Kd (1/s) irradiada
I2C12	0.0101	$4,13 \times 10^{-3}$
I2E12	$8,53 \times 10^{-3}$	$3,91 \times 10^{-3}$
I4E7	0,0181	$4,61 \times 10^{-3}$
I6D12	$6,72 \times 10^{-3}$	$4,68 \times 10^{-3}$
I7C9	$2,99 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-3}$
I7D12	0,0111	$4,23 \times 10^{-3}$
I8E9	$1,99 \times 10^{-4}$	$6,35 \times 10^{-4}$
I10A4	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,82 \times 10^{-3}$

Pode se ver que alguns anticorpos, apesar de se ligarem a ambas as formas do antígeno, tem maior afinidade pela toxina irradiada. Outros apresentam Kds semelhantes para ambas as formas da toxina.

Comparando-se o comportamento dos anticorpos nos dois tipos de ensaio realizados (toxina ligada ao chip e toxina capturada por anticorpos ligados ao chip) notamos que há diferenças significativas no padrão de ligação (figuras 27 e 28).

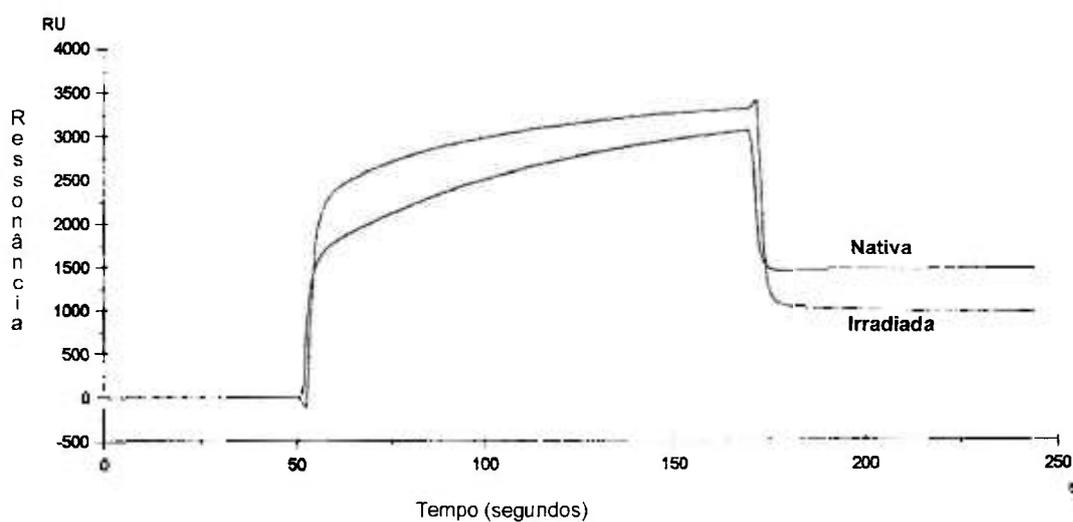


Figura 27: comparação da reatividade do anticorpo I8F2 frente à toxina nativa ou irradiada com 2000 Gy. Neste ensaio, a toxina foi ligada diretamente ao chip.

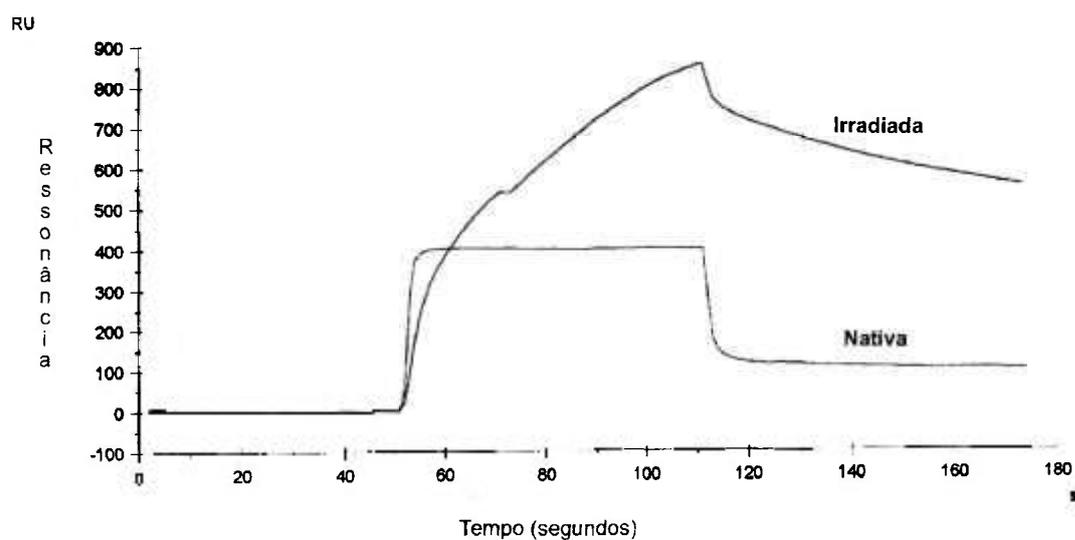


Figura 28: comparação da reatividade do anticorpo 18F2 frente à toxina nativa ou irradiada com 2000 Gy. Neste ensaio, os anticorpos monoclonais foram capturados por sua porção Fc, sendo a toxina injetada em seguida.

No primeiro ensaio, o anticorpo parece se ligar preferencialmente à toxina nativa, enquanto no experimento onde a toxina era capturada este padrão se inverteu.

5 Discussão

A metodologia de purificação utilizada se mostrou adequada, resultando em uma proteína com alto grau de pureza, não tendo sido detectados contaminantes quando a amostra foi analisada por eletroforese ou sequenciamento n-terminal. A análise por espectrometria de massa evidencia a existência de outras moléculas na fração purificada, todavia em concentrações muito baixas. O método inicialmente descrito para purificar a bothropstoxina ³³ envolvia uma gel-filtração, seguida de uma cromatografia de troca catiônica. Conseguiu-se padronizar um método mais prático com uma única cromatografia, reduzindo o tempo de purificação em cerca de 140 vezes ⁶³.

A irradiação da toxina não levou à formação de agregados insolúveis, ao contrário do que foi observado para a crotoxina ^{48, 49, 50}. Considerando-se que a crotoxina nativa é pouco solúvel e que para aumentar a solubilidade da mesma é necessário abaixar o pH do solvente (J.R. Rogero, comunicação pessoal), é possível que mínimas alterações desta toxina, decorrentes da irradiação, a tornem ainda mais insolúvel, levando assim ao aparecimento de precipitados. Esta hipótese é corroborada pelo fato de Nascimento ^{49, 50} ter conseguido diminuir a quantidade de proteína irradiada insolúvel ao baixar o pH da solução antes de irradiá-la. Este comportamento da crotoxina sugere que a diminuição de solubilidade envolve aminoácidos carregados da superfície da molécula. Para a bothropstoxina, o problema de solubilidade não ocorre, sendo a mesma solúvel em todos os tampões até hoje testados por nosso grupo.

Trata-se de uma molécula com grande quantidade de resíduos básicos : 5 argininas e 19 lisinas ¹⁴, perfazendo 20% do total de aminoácidos.

Este acúmulo de cargas positivas certamente torna a proteína muito solúvel em solventes aquosos. Se somarmos todos os aminoácidos hidrofóbicos contidos na bothropstoxina-1, veremos que representam 29% do total (figura 29).

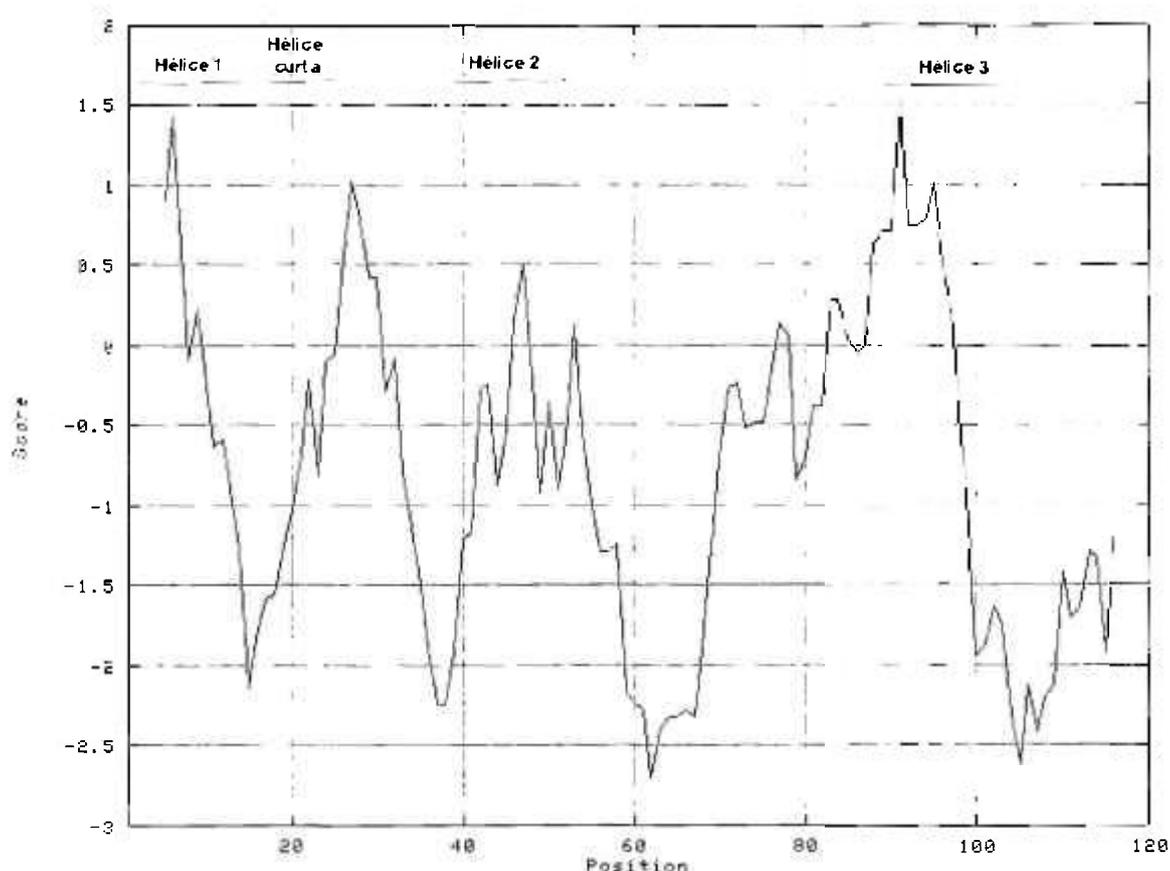


Figura 29: perfil de hidrofobicidade da bothropstoxina-1 de acordo com a escala de Kyte & Doolittle ³⁸. As abcissas representam a posição do aminoácido na estrutura primária e as ordenadas o índice de hidrofobicidade. São consideradas hidrofóbicas todas as regiões em que $y > 0$.

Sabe-se que a grande maioria deles se localiza na interface de contato entre as hélices 2 e 3, assim como no canal hidrofóbico, não estando portanto expostos ao solvente^{26, 67}.

Sabe-se também que as sete pontes dissulfeto que encerra conferem rigidez á bothropstoxina, dificultando a exposição dos seus grupamentos apolares à água⁶⁷. Estas características poderiam explicar a ausência de precipitados nas amostras irradiadas.

A bothropstoxina irradiada apresenta um espectro muito complexo quando analisada por espectrometria de massa de electrospray. Este fato sugere a formação de derivados oxidados da toxina com variado grau de modificação. A mesma análise, quando realizada por MALDI-TOF não revelou este fato em função da menor resolução do método. No entanto esta metodologia evidenciou a presença da toxina na forma monomérica, dimérica, trimérica e tetramérica para a amostra nativa. Quando analisamos as amostras irradiadas, notamos que as formas poliméricas da toxina não são mais detectáveis. Esta transição da forma multimérica para monomérica em decorrência da irradiação também foi detectada para a crotamina (M. Boni-Mitake, comunicação pessoal). No entanto, não podemos esquecer que, em ambas as metodologias, as amostras são submetidas a condições em que interações intermoleculares enfraquecidas pela ação da radiação podem ser aniquiladas. Para a espectrometria de massa baseada na ionização por eletrospray, as moléculas são primeiramente submetidas a uma cromatografia de fase reversa em pH 2, 0 onde o contato com solvente orgânico pode interferir com interações hidrofóbicas e o pH interferir na distribuição de cargas de superfície.

Por fim, ao adentrar o analisador, a proteína ionizada entra em contato com um gás de secagem (N_2) a $60^\circ C$, o que poderia promover alterações estruturais. Na técnica em que se emprega desorção assistida por laser, a proteína é submetida a condições mais brandas, todavia a mesma se encontra em uma matriz ácida, sendo ionizada por um feixe de luz laser e direcionada para o detector por uma diferença de potencial da ordem de -20000 volts. A conjugação de tais condições pode também mascarar interações monômero-monomêro enfraquecidas pela ação da radiação. Esta afirmação é corroborada pelo perfil cromatográfico da toxina irradiada, onde o dímero que não foi detectado pela espectrometria de massa aparece de forma clara.

Os experimentos de dicroísmo circular mostram que ocorre uma diminuição do mínimo a 222 nm, característico da alfa-hélice, quando a toxina é irradiada. Esta modificação não é observada com a menor dose de radiação por nós utilizada (500 Gy) mas torna-se evidente quando observamos os espectros da toxina irradiada com 1000 e 2000 Gy. Notamos também que os espectros da toxina irradiada com 1000 e 2000 Gy são muito semelhantes. Conforme já dissemos, a estrutura da toxina é bastante rígida, sendo estabilizada pelas 7 pontes S-S e por contatos hidrofóbicos entre as hélices 3 e 4. Acreditamos que esta rigidez dificulte alterações conformacionais, limitando-se estas a regiões mais flexíveis da molécula. Quando analisamos a toxina irradiada com 2000 Gy após redução de suas pontes dissulfeto, notamos que ocorre uma mudança drástica do espectro CD, evidenciando a importância destas ligações covalentes na manutenção dos elementos estruturais.

Desta análise podemos concluir que a irradiação promove alterações na toxina, mas que seus elementos estruturais são em boa parte conservados, estando estabilizados por ligações covalentes intramoleculares. Sabe-se que quanto mais longa a cadeia de aminoácidos entre 2 cisteínas que formam uma ponte S-S, maior o efeito estabilizador desta sobre a estrutura do peptídeo^{3, 41}. A menor distância entre duas cisteínas covalentemente ligadas na BthTx-1 é de 12 aminoácidos (Cys 84-Cys96) estando as outras cisteínas formadoras de pontes S-S separadas por distâncias significativamente maiores. Sabe-se também que múltiplas pontes S-S em uma proteína tem efeito aditivo na estabilização da mesma na sua conformação nativa⁴⁰. Adicionando-se os efeitos da longa distância entre as cisteínas formadoras de ligações covalentes e da grande quantidade destas ligações, fica claro que a energia envolvida na estabilização da toxina deve ser alta. Quando a bothropstoxina foi submetida a denaturação térmica, pudemos ver que ocorria uma diminuição gradativa da entalpia em função da dose de radiação, evidenciando um deslocamento do equilíbrio nativo↔denaturado para a direita, ou seja, um aumento de entropia. No mesmo experimento, a faixa de temperatura em que ocorreu a transição do estado nativo para o denaturado aumentou em função da dose de radiação. Se a população de moléculas nas amostras irradiadas tivesse sido homoganeamente modificada, o esperado seria um deslocamento da curva de fusão ,como um todo, para a esquerda, e um ponto de fusão menor, o que não foi observado.

Estes fatos sugerem que a radiação promoveu o aparecimento de bothropstoxina com conformações variadas e conseqüentes variadas estabilidades térmicas (entalpias).

A bothropstoxina-1 contém um único resíduo de triptofano, na posição 77¹⁴,²⁶. Este aminoácido está localizado na extremidade da asa beta²⁶, na interface de contato das subunidades do homodímero. Esta propriedade torna esta proteína um modelo ideal para estudar modificações de estrutura quaternária decorrentes da irradiação. Excitando-se a cadeia lateral deste aminoácido com o comprimento de onda adequado, é possível avaliar o quanto esta se encontra acessível ao solvente.

Ao analisarmos as constantes de Stern-Volmer da proteína nativa, notamos que existe um equilíbrio entre uma forma da toxina em que o triptofano está pouco exposto (dímero), e outra em que este aminoácido está mais acessível (monômero). A cromatografia de exclusão molecular da toxina irradiada com 2000 Gy resultou em dois picos. O primeiro é constituído de uma forma de alto peso molecular, com menor constante de Stern-Volmer, sugerindo predomínio da forma dimérica, enquanto o outro, com maior constante de atenuação, aponta para um triptofano mais exposto, indicando um deslocamento do equilíbrio para a forma monomérica da proteína.

No experimento seguinte, investigamos se a exposição do cromóforo era um fenômeno dose dependente. De acordo com nossos dados, parece ocorrer uma exposição gradual do anel aromático seguindo um padrão dependente da dose de radiação.

Curiosamente, houve diferenças significativas entre os espectros de fluorescência em pH 5 e 7. Em pH 5, o triptofano encontra-se mais exposto e, ao aumentarmos o pH para 7, o mesmo parece adentrar mais o ambiente hidrofóbico formado pela área de contato entre as asas beta do dímero. Concluímos que a estrutura quaternária da bothropstoxina parece ser dependente de pH.

Tivemos a oportunidade de medir o pH de venenos botrópicos e crotálicos recém extraídos. Em ambos os casos, estas secreções apresentaram pH em torno de 5, o que pode ser atribuído a elevada concentração de íons citrato encontrada em venenos ofídicos (Ivan Kaiser, comunicação pessoal). Isto leva a crer que, ao adentrar a corrente sangüínea, a toxina sofre uma alteração em sua estrutura quaternária. Acreditamos que seria interessante investigar o quanto esta mudança é relevante para a atividade da toxina.

Propusemo-nos então a investigar o papel das pontes S-S na estrutura quaternária da toxina. Após redução das mesmas, notamos que a toxina nativa apresentava seu triptofano mais acessível à água. Este achado corrobora as observações de Giotto²⁶ que, ao submeter a BthTx-1 a eletroforese, notou que na ausência de agentes redutores a mesma se comportava como um dímero. Ao analisarmos a toxina irradiada, percebe-se que ocorre uma diminuição gradativa do rendimento quântico. Isso nos leva a crer que mesmo após a redução das pontes S-S, o triptofano ainda se encontra parcialmente “enterrado” na interface de contato, sendo exposto gradualmente, conforme aumentamos a dose de radiação.

Na etapa seguinte deste trabalho, o nosso objetivo foi produzir anticorpos monoclonais contra a bothropstoxina-1 nativa e irradiada com 2000 Gy. Após a obtenção dos hibridomas, ficou claro que o baço do animal imunizado com a toxina irradiada continha um número significativamente maior de células produtoras de IgG anti-bothropstoxina. Uma hipótese para explicar esta diferença seria que as células apresentadoras de antígeno captariam de maneira mais eficiente a toxina irradiada por intermédio de seus receptores scavenger.

Cardi *et al.*⁹ mostraram que tal fato ocorre para a crotoxina irradiada. Desta forma, um maior número de fragmentos do antígeno, associado a moléculas MHC II estaria sendo apresentado. Devemos também levar em consideração o fato da radiação causar modificações estruturais na bothropstoxina-1. Com estas modificações, é possível que a proteína passe a apresentar novos epitopos, ficando assim passível de se ligar a uma variedade maior de imunoglobulinas de superfície de células B.

O mapeamento de epitopos por ressonância plasmônica de superfície permitiu selecionar clones produtores de anticorpos com afinidade contra diferentes domínios da proteína. Cabe salientar que o mapeamento de epitopos com biosensores não visa determinar a localização exata de um dado epitopo, e sim prover o experimentador com um mapa funcional da superfície do antígeno⁶⁴.

Após subclonagem e isotipagem, procuramos avaliar o comportamento destes anticorpos frente a toxina nativa e irradiada com 2000 Gy pela mesma técnica. Em um primeiro ensaio a toxina foi acoplada diretamente ao “chip”, injetando-se então os anticorpos a serem testados. Com esta metodologia, pudemos avaliar a reatividade das IgGs.

Em um segundo experimento, o antígeno foi capturado pelos anticorpos a serem testados. Com os dados obtidos foi possível estimar a constante de dissociação dos monoclonais. Algumas discrepâncias podem ser observadas: no primeiro ensaio, o anticorpo I2C12 mostra baixa reatividade frente à toxina irradiada e o anticorpo I2E12 apresenta baixa reatividade contra o antígeno nativo.

No segundo experimento, I2C12 apresenta um K_d de 0,0101 frente ao antígeno nativo, e de $4,13 \times 10^{-13}$ frente à toxina irradiada, sugerindo maior afinidade pelo ligante radiomodificado. Um fenômeno semelhante ocorre com o anticorpo I2E12; no primeiro ensaio, o mesmo se comporta como se apresentasse maior afinidade pela toxina irradiada, entretanto, ao determinarmos a sua constante de dissociação, vemos que a mesma é similar para ambas as formas da toxina. Esta aparente contradição pode ser atribuída a diferenças de acessibilidade dos anticorpos a seus epítopos. No primeiro ensaio, a toxina foi acoplada ao chip por seus grupamentos amina. A bothropstoxina-1 contém 19 lisinas, e a maioria destas se encontram na superfície da molécula formando domínios catiônicos⁶⁰. Ao estarmos ligando a toxina por estas regiões, é possível que estejamos orientando seletivamente a molécula. Para a toxina irradiada, a organização espacial das cadeias laterais destas lisinas pode ter sido modificada, alterando a acessibilidade do anticorpo ao seu ligante. Outra hipótese aventada para justificar estas discrepâncias é que, quando a toxina nativa é ligada de forma covalente às moléculas de dextrana que recobrem o chip, a mesma pode sofrer alterações em sua conformação⁶⁴, adquirindo uma estrutura similar à da toxina irradiada.

Ao avaliarmos a reatividade de alguns destes anticorpos por western-blot, pudemos perceber que a maioria deles reage contra o antígeno denaturado mostrando que apresentam afinidade por epitopos contínuos (lineares). Este fato é bastante curioso, uma vez que vários autores ⁶⁴, (B. Lomonte, comunicação pessoal) relatam que, ao produzirem anticorpos contra toxinas Lys49, obtinham anticorpos com afinidade por epitopos conformacionais.

Considerando que todos os monoclonais testados no western-blot vinham de clones do animal imunizado com toxina irradiada, é tentador sugerir que, de alguma forma, a irradiação direcionou a produção de anticorpos contra epitopos lineares. Estes anticorpos, se apresentarem reatividade cruzada com outras miotoxinas Lys49, poderiam ser utilizados para detecção de novas miotoxinas em venenos . Por outro lado, todos os anticorpos testados reconheceram o antígeno não irradiado quando ensaiados por ELISA ou ressonância. Desta forma, parece que estes epitopos lineares se encontram na superfície da toxina. De acordo com o mapeamento de epitopos, dispomos de 11 anticorpos com afinidade por determinantes antigênicos distintos e não sobreponíveis contra a bothropstoxina. Dado o diminuto tamanho da toxina, acreditamos que dentre estes anticorpos deve-se encontrar algum com capacidade de neutralizar a ação da mesma. Se esta hipótese fosse comprovada, seria possível localizar a região da molécula a que o anticorpo se liga, e desenhar imunógenos mais eficientes ou ainda incluir o anticorpo purificado no soro antitóxico comercial.

6 Conclusões

- A irradiação não leva à formação de agregados insolúveis, diferentemente do que ocorre com a crotoxina ou o veneno crotálico.
- A toxina nativa ocorre na forma de monômero e multímeros.
- Não foi possível detectar os multímeros por espectrometria de massa nas toxinas irradiadas, mostrando que a interação entre seus componentes é abolida durante a análise.
- A amostra irradiada com 2000 Gy apresenta um espectro de massa que sugere a coexistência da bothropstoxina em vários estados de oxidação.
- Os ensaios de dicroísmo circular mostram que ocorre uma perda gradual de *estrutura secundária em função da dose de radiação* e que a conformação da molécula irradiada é estabilizada pelas pontes dissulfeto.
- A diminuição da entalpia da bothropstoxina em função da dose de radiação evidencia alterações na estabilidade da estrutura secundária e terciária da molécula.
- As soluções irradiadas são constituídas de uma mistura de moléculas com grau variado de denaturação.
- A radiação promove a exposição gradativa do triptofano, evidenciando alterações da estrutura quaternária.
- A imunização de animais com BthTx-1 irradiada induz a formação de IgGs capazes de reconhecer a toxina nativa.
- Esta resposta imune parece estar preferencialmente direcionada a epitopos lineares.

7.Referências bibliográficas

- 1) ANDRIANI, E.-Irradiação da crotoxina em solução aquosa:influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas. São Paulo, 1995. (dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 2) BERLETT, B.S. & STADTMAN, E. R.- Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, 272(33):20313-20316, 1997
- 3) BRANDEN, C. & TOOZE, J.- Prediction, engineering and design of protein structure. *In* Introduction to protein structure : 247-268, Garland Publishing, New York, 1991.
- 4) BRAZIL, V.-Serumtherapia antiophidica. **Rev. Med. Sao Paulo**, 12. 293-307, 1909
- 5) BUTLER,J.; LAND,E.J & SWALLOW,A.J.-Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. **Radiat. Phys. Chem.**,24:273-82,1984.
- 6) CALDERON, L. & LOMONTE, B.- Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. . **Arch-Biochem-Biophys.** 358(15): 343-350, 1998.
- 7) CALDERON, L. & LOMONTE, B.-Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115-129. **Toxicon**, 37:683-687,1999.

- 8) CAMARGO-GUARNIERI, M.-Estudo dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*. São Paulo, 1992. (tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares)
- 9) CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N. & ANDRADE Jr., H.F.-Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ^{60}Co γ -rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int. J. Radiat. Biol**, 73 (5): 557-564, 1998.
- 10) CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N. ; ROGERO, J.R. & ANDRADE Jr., H.F.-Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 25 :905-908, 1992.
- 11) CARREDANO, E.; WESTERLUND, B.; PERSSON, B.; SAARINGEN, M.; RAMASWAMY, S.; EAKER, D. & EKLUND, H.-The tridimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A2. **Toxicon**, 36 (1):75-92, 1998.
- 12) CHANG, C.C. & SU, J.M.- The mechanism of potentiation of the presynaptic effect of phospholipase A2 by the crotoxin component of the crotoxin complex. **Toxicon**, 16 : 402-405, 1978.
- 13) CHIPPAUX, J.P.; WILLIAM, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29:1279-1303, 1991.
- 14) CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. & GIGLIO, J.R.- Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein Chem.**, 12 (1):57-64, 1993.

- 15) COSTA, L.M.; TAKEDA, A.K., BARBOSA, S.F.C.; BERRA, J.A.P.; ADELINA, M.G.F.; SOERENSEN, B.; PINTO, J.R. & VANCETTO, M.D.C.- Estudo comparativo da resposta imune em cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus in natura*, tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. **Vacinas e Soros**, 1:24-29, 1985.
- 16) CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; MENEZES, J.B. & HERING, S.E.- Reações de hipersensibilidade imediata após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33(2):115-122, 1991
- 17) DAVIDSON, F.F. & DENNIS, E.A.- Structure, function and mode of action of snake venom and other phospholipases A2. *In Handbook of Natural Toxins*, (5), (Tu, A.T., Ed.) :107-145, Dekker, New York, 1991.
- 18) DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R. & SANTOS, M.J.- Cross reactivity of horse monovalent antivenoms antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. **Mem. Inst. Butantan**, 51:153-168, 1989.
- 19) DIAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIERREZ, J.M.- Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A2 reduces its membrane-destabilizing effect. **Arch-Biochem-Biophys.** 312(2): 336-339, 1994.
- 20) DOS-SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R. de C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTTIERREZ, J.M. & FURTADO, M. de F.- A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 34(2):77-83, 1992.

- 21) EDMAN, P.- Sequence determination. **Mol. Biol. Biochem. Biophys.**, 8: 211-255, 1970.
- 22) FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M. & BON, C. -the origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, 223:161-164, 1994.
- 23) FLETCHER, J.E.; SELISTRE DE ARAUJO, H. & OWNBY, C.L.-Molecular events in the myotoxic action of phospholipases. In: *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function & mechanism* (R. M. Kini, ed.) John Wiley & Sons, Ltd, Sussex. 1997.
- 24) FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B & KAISER, I.I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a Lysine-49 phospholipase A2 **Arch. Biochem. Biophys.**, 284:352-359, 1991.
- 25) GALLACCI, M.; NUNES, E.C.; MOREIRA, E.G.; NASCIMENTO, N.; ROGERO, J.R. & VASSILIEFF, V.S.- Reduction of crotoxin-induced neuromuscular blockade by gamma radiation. **Toxicon**, 36 (6):941-945, 1998.
- 26) GIOTTO, M.T.-Estrutura cristalográfica da bothropstoxina-I, uma miotoxina K 49. 1996. (Tese de doutorado, Instituto de Física de São Carlos).
- 27) GUIDOLIN, R.; DIAS DA SILVA, W.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; LIMA, M.L.S.R., MORAIS, J.F.; PINTO, J.R. & MARCELINO, J.R.- Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. **Mem. Inst. Butantan**, 51: 85-90, 1989.

- 28) HABERMANN, E. & BREITHAUPT, H.- The crotoxin complex: an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, 16 :19-30, 1978
- 29) HALLIWELL, B. & GUTTERIDE, J.M.C.-The chemistry of oxygen radicals and other oxygen derived species. In: HALLIWELL, B. & GUTTERIDE, J.M.C.(Eds) **Free radicals in biology and medicine** (2nd edition). Clarendon press, Oxford, U.K., 1989.
- 30) HAWGOOD, B.J. & SMITH J.W.- The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotoxin complex isolated from the venom of the South American rattlesnake. **Br. J. Pharmacol.**, 61: 597-606, 1977.
- 31) HENEINE, I.F.; HENEINE, L.G.D.; DANIEL, J.P.; NASCIMENTO, M.C.S. & ROCHA, O.A.- Properties of protein toxins and venoms modified by controlled iodination. **Anais Acad. Ciências Est. São Paulo**, 5711:55-66, 1988.
- 32) HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F. & DIAS DA SILVA, W.- Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de protease e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. **Mem. Inst. Butantan**, 51: 107-115, 1989.
- 33) HOMSI-BRANDENBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTOS-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, C.L. & GIGLIO, J.R.-Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom :partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26:473-479, 1988.

- 34) JOHN, T.R.; SMITH, J.J. & KAISER, I.I.- A phospholipase A2-like pseudogene retaining the highly conserved introns of mojave toxin and other snake venom group II PLA2s, but having different exons. **DNA and Cell Biol.**, 15 (8):661-668, 1996.
- 35) JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A.- Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, 36 (2):66-77, 1990.
- 36) KINI, R.M. & EVANS, H.J.- A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, 27:613-635, 1989.
- 37) KUME, T. & MATSUDA, T.-Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. **Radiat. Phys. Chem.**, 46:225-231, 1995.
- 38) KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F.- A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, 157: 105-132, 1982.
- 39) LAEMMLI, U.K.-Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.
- 40) MATSUMARA, M.; SIGNOR, G. & MATTHEWS, B.W.-Substantial increase of proteins stability by multiple disulphide bonds. **Nature**, 342: 291-293, 1989.
- 41) MATTHEWS, B.W.; NICHOLSON, H. & BECKTEL, W.J.-Enhanced protein thermostability from site directed mutations that decrease the entropy of unfolding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 6663-6667, 1987
- 42) MOREIRA, E.G.; NASCIMENTO, N.; ROSA, G.J.M.; ROGERO, J.R. & VASSILIEFF, V.S.- Effect of gamma irradiation on the behavioral properties of crotoxin. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 30 :245-249, 1997.

- 43) MOROZ, C.; GOLDBLUM, N. & De VRIES, A.- Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethylcellulose bound neurotoxin as antigen. **Nature**, 200 :228-233, 1963.
- 44) MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F. & TANIZAKI, M.M.-Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, 28:1293-1301,1990.
- 45) MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M.; MOTA, I.- Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon**, 29:1471-1480, 1991.
- 46) MOURA DA SILVA, A.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; NISHIKAWA, A.K.; BRODSKIN, C.L.; DOS SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.D.; DIAS DA SILVA, W. & MOTA, I. -Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops* . **Toxicon**, 28:181-188, 1990.
- 47) MURATA, Y.-Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. São Paulo, 1988. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 48) NASCIMENTO, N.-Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos. São Paulo, 1991. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 49) NASCIMENTO, N. -Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina. São Paulo, 1995. (Tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

- 50) NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R. & KAISER, I.I.-Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, 34:123-131, 1996.
- 51) NICOLETTI, A ; CALIGIURI, G.; TÖRNBERG, I.; KODAMA, T.; STEMME, S. & HANSSON, G.- The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. **Eur. J. Immunol.**, 29:512-521, 1999.
- 52) OKONOGI, T.; HATTORI, Z.; OGISO, A. & MITSUI, S.- Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. **Toxicon**, 17:524-527, 1979.
- 53) OWNBY, C.L.- Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. *in* Handbook of Toxinology (Shier, W.T. & Mebs, D., Eds.) :601-654, Dekker, New York, 1990.
- 54) OWNBY, C.L.-Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol-Toxin reviews**, 17 (2):213-238, 1998.
- 55) PEDERSEN, J.Z.; LOMONTE, B.; MASSOUD, R.; GUBENSEK, F.; GUTIERREZ, J.M. & RUFINI-S -Autocatalytic acylation of phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, 34(14): 4670-4675, 1995
- 56) PINHO, J.R.R.; CARDI, B.A.; ANDRADE Jr., H.F.; BARR, P.J.; BATHURST, I.C.; VICENTE, E.J. & SCHENBERG, A.C.-Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed type hypersensitivity after gamma irradiation. **Int. J. Leprosy**, 63: 381-390, 1995.

- 57) RELYVELD, E.H.; GIRARD, O.; CHEYROUX, M.; ASSO, J. & De RUDDER, J.-
Nouveau procédé d'inactivation pour la preparation de vaccins. *In*
Developments in Biological Standardizations, 27:236-348, 1974.
- 58) SCHAGGER, H. & VON JAGOW, G.- Tricine-sodium dodecil sulfate-
polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range
from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, 166 (2): 368-379, 1987.
- 59) SCHELLMAN, J.A. & HAWKES, R. B.- *In* "Protein Folding" (Jaenicke, R. Ed.),
Elsevier/North-Holland Medical Press, 331-341, 1980
- 60) SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P. & OWNBY, C.L.-cDNA cloning
and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from
Agkistrodon contortrix laticinctus snake venom. **Arch.Biochem.**
Biophys.,326:21-30,1996.
- 61) SKALKA, M. & ANTONI, F.-Effect of radiation on the biological properties of
proteins. *in*: Radiation sensitivity of toxins and animal poisons. 1-13, Ed. Int.
Atomic Energy Agency, 1970.
- 62) SPENCER, P.J.- Alterações bioquímicas do veneno de *Bothrops jararacussu*
irradiado com ⁶⁰Co. São Paulo, 1995. (Dissertação de mestrado, Instituto de
Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 63) SPENCER, P.J.; AIRD, S.D.; BONI-MITAKE, M.; NASCIMENTO, N. &
ROGERO J.R.- A single-step purification of bothropstoxin-1. **Braz. J. Med.**
Biol. Res. 31 (9) :1125-1127, 1998.

- 64) STILES, B.G. & CHOUMET, V.- Antibody studies with venom phospholipases. *In Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function & mechanism* (R. M. Kini, ed.) John Wiley & Sons, Ltd, Sussex. 1997.
- 65) TOWBIN, H. & GORDON, J.- Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. **J. Immun. Methods**, 72 : 313-340, 1984.
- 66) TEJASEN, P. & OTTOLENGHI, A. – The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. **Toxicon**, 36 : 225-233, 1970.
- 67) WARD, R.J.; DE AZEVEDO Jr., W.F. & ARNI, R.K.-At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**, 8(11):1623-1633, 1998.