

AVALIAÇÃO DA PUREZA DE SOROS ANTIOFÍDICOS BRASILEIROS E
DESENVOLVIMENTO DE NOVA METODOLOGIA PARA ESSA FINALIDADE

Filipe Soares Quirino da Silva

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone

Co orientador: Prof. Dr. André Luis Gemal

Rio de Janeiro

2008

Avaliação da pureza de soros antiofídicos Brasileiros e Desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade

Filipe Soares Quirino da Silva

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

Professor: Saulo Cabral Bourguignon

Professora: Cássia Ribeiro Ponciano (suplente)

Professor: Floriano Paes da Silva Junior

Professora: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (suplente)

Orientador: Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone

Co orientador: Prof. Dr. André Luis Gemal

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Filipe Soares Quirino

Avaliação da pureza de soros antiofídicos Brasileiros e Desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade /Filipe Soares Quirino da Silva. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

xx, 165p, fig., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária /INCQS, 2008. Orientador: Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone Co orientador: Prof. Dr. André Luis Gemal

1. Soros Antiofídicos. 2. Controle de Qualidade. 3. Espectrometria de massas
4. Eletroforese bidimensional. 5. Predição de epítomos. 6. Mapeamento de epítomos
7. Peptídeos sintéticos. 8 Preparo de antisoros

I. Desenvolvimento de novos métodos para a avaliação da pureza de soros antiofídicos

Purity evaluation of Brazilian snake antivenoms and development of a new method for quality evaluation.

RESUMO

Nesse trabalho, analisou-se a pureza de soros antiofídicos utilizados no Programa Nacional de Imunizações. Fez-se a avaliação com base no teor e composição de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, de soro antibotrópico. O principal componente identificado foi o fragmento $F(ab)'_2$ – fração relevante para o efeito protetor do soro. Também se verificou a presença de proteínas contaminantes. Estas proteínas foram caracterizadas por western blot e espectrometria de massas, após a separação por eletroforese bidimensional. Os contaminantes identificados foram a IgG, albuminas eqüina e de asno, fragmentos da região variável da cadeia pesada e fragmentos de albumina. A concentração desses contaminantes varia bastante de um produtor para o outro, sendo que um dos produtores apresentou uma pureza substancialmente melhor que os demais.

Desenvolveu-se um anticorpo para um método que visa a avaliação do conteúdo de imunoglobulina eqüina íntegra nos soros. Iniciou-se o desenvolvimento pela predição de epítomos na cadeia pesada da imunoglobulina eqüina, utilizando modelagem molecular. Nove prováveis epítomos foram identificados. O mapeamento dos epítomos utilizando a técnica de spot síntese confirmou a maioria das predições e possibilitou a identificação dos três mais reativos frente ao soro de coelho imunizado com IgG eqüina. Com base nesses resultados preparou-se um conjugado do peptídeo correspondente ao epítomo mais reativo com o toxóide tetânico. A imunização de coelhos com esse conjugado levou à obtenção de soro que apresentou reatividade frente à imunoglobulina eqüina, confirmando a possibilidade de seu uso como reativo para esse fim.

Nenhum lote avaliado foi considerado insatisfatório frente à legislação vigente para soros antiofídicos. Da comparação da legislação em vigor com o estado da arte das indústrias de biotecnologia inferiu-se a necessidade de adequação desta lei, de maneira a considerar especificações que garantam uma melhor qualidade dos soros nacionais. Em função das diferenças nos resultados da avaliação de pureza das amostras de diferentes produtores, sugere-se a adoção de um programa de investimento para a nivelção tecnológica dos fabricantes.

ABSTRACT

A purity evaluation of antivenoms used in the Brazilian National Immunization Program was performed in this work. The main parameters used were total amount of protein and protein composition by SDS PAGE. The most important identified component was F(ab')₂ fragment, the relevant molecule for antivenom effect. Contaminant proteins were also present. These contaminants were characterized by western blot and mass spectrometry, after two dimensional electrophoresis separation. Identified contaminants were IgG, albumin horse and donkey, fragments from antibodies chains and albumin fragments. The amount of contaminants had a great variation from one producer to the other, and one manufacture had a better purification process than the others.

A reagent for IgG identification in antivenoms was also developed. First, epitopes in horse IgG heavy chain were predicted using different molecular modeling methods. Eleven epitope candidates were identified. Epitope mapping confirmed most of the predicted sequences and the three most reactive epitopes were identified. With these results, a conjugate between tetanus toxoid and a synthetic peptide was prepared. Rabbits were immunized with this conjugate, and after a second buster a high titer of antibodies against horse immunoglobulin was obtained. This serum has the potential applicability to detect IgG in antivenoms.

None of the batches was unsatisfactory to Brazilian guidelines for antivenom production. This guideline must be updated, because it is old and the biotechnology industry had a lot of advances in last years. New regulatory specifications are the first step for better quality products. An investment program for the manufactures is also necessary, to adequate the purification process to most rigorous specifications.

AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas, de várias formas diferentes, ajudaram na realização desse trabalho. Tentando não ser injusto a ninguém, os principais agradecimentos são:

- Ao orientador Professor Dr. Salvatore Giovanni de Simone, que me deu a oportunidade de trabalhar com várias técnicas avançadas.
- Ao co-orientador, Professor Dr. André Luís Gemal, que apesar de sua falta de tempo, concordou em participar desse trabalho.
- As amigas do Laboratório de Produtos Biológicos, Departamento de Química, Claudia Maria da Conceição e Sinea Mendes de Andrade, ajudaram a levar o trabalho do setor nesse período.
- A todas as bolsistas passaram no laboratório nesse período, em ordem alfabética: Ana Carla Rodrigues Correia, Ana Paula Oliveira, Anna Carolina Machado Marinho, Fernanda Gomes, Shirley da Silva e Simone Sant'anna Souza, que sempre ajudaram de alguma forma na realização dos trabalhos experimentais.
- Agradeço especialmente a bolsista Laura Lisboa Calassara que ajudou na realização da maioria dos experimentos
- Aos chefes do Departamento de Química do INCQS no período Kátia Miriam Peixoto Menezes, Marcio Labastie (*in memorium*) e Mariete Ferreira Lemos.
- Ao Coordenador do Grupo Técnico de Produtos Biológicos do INCQS, Eduardo Jorge Rabello Netto, que sempre foi muito solícito para fornecer e conseguir informações importantes citadas nesse trabalho.
- A Carmem Lúcia Miranda Silvera e Laura Dina Bedin Bertollo S. Arruda, da Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações, pelas informações gentilmente cedidas.
- Ao chefe do Serviço de Animais de Laboratório do INCQS Reginaldo Assad Miller e a Saulo de Tarso Borges Nogueira, que ajudaram de forma fundamental na realização dos trabalhos de experimentação animal.

- Aos colegas do curso de pós-graduação em Vigilância Sanitária, especialmente a Luciana Lobianco, Luciane Martins Medeiros e Sonia Dória.
- A nossa colega de pós-graduação Marília Miguez (*in memoriam*), pessoa de que nunca nos esqueceremos.
- Ao Doutor Floriano Paes da Silva Junior, pesquisador do Laboratório de Bioquímica de Peptídeos e Proteínas (IOC-Fiocruz), cuja ajuda foi fundamental na realização dos experimentos de modelagem molecular e predição de epítopos, e também pela cuidadosa revisão deste trabalho.
- Aos Professores Doutores Saulo Cabral Bourguignon (IB-UFF) e Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (DI-INCQS), pelas sugestões e críticas.
- A Jéssica Joy Mokfienski e Thatiane de Simone, do Laboratório de Bioquímica de Peptídeos e Proteínas (IOC-Fiocruz), cuja ajuda foi fundamental na realização dos experimentos de determinação de epítopos.
- A todos os amigos de Far-manguinhos, em especial a Doutora Mônica Bastos Macedo e Lúcia Maria Mayer, que com uma enorme boa vontade cederam reagentes que foram essenciais à realização do trabalho.
- A Doutora Ivna Alana da Silveira, do Laboratório de Tecnologia Bacteriana (Bio-manguinhos/Fiocruz), que gentilmente cedeu o Toxóide Tetânico usado no trabalho.
- A Doutora Cássia Ribeiro Ponciano, do Departamento de Física da PUC, amiga de longa data, que ajudou muito na realização desse trabalho.
- A Letícia Lery, do Instituto de Biofísica da UFRJ, que ajudou na realização dos espectros de massas e na busca de proteínas em programas da internet.
- Aos meus pais e irmãos, cujo convívio familiar sempre me estimulou ao estudo e ao aperfeiçoamento.
- Aos dois amores de minha vida, minha esposa Telma e a minha filha Carolina, que me ajudaram na travessia desse momento difícil.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| ABF | Azul de bromofenol |
| AC | Ácido caprílico ou ácido n-octanóico |
| ACN | Acetonitrila |
| ACHC | Ácido alfa ciano para hidroxí cinâmico |
| BPF | Boas Práticas de Fabricação |
| BSA | Do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| CDP start® | Reagente para quimioluminescência a revelação com fosfatase |
| CDR | Do inglês <i>Complementarity Determinant Region</i> , 1-3 |
| CENADI | Central Nacional de Distribuição de Imunobiológicos |
| CGPNI | Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações |
| C _{Hn} | Domínios constantes da cadeia pesada da imunoglobulina, (n de 1 até 3) |
| CID | Do inglês <i>Collision Induced Dissociation</i> |
| C _L | Domínio constante da cadeia leve da imunoglobulina |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CPPI | Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos, Piraquara PR |
| CS | Cobertura de seqüência |
| DL ₅₀ | Dose letal em 50% dos casos |
| D.O. | Densidade ótica |
| DP | Desvio padrão |
| DTT | Ditiotreitól |
| EDC | Etil N,N dimetilpropilcarbodiimina |
| EDTA | Ácido etileno diaminotetraacético |
| EDU | Etil-NN-dimetilpropiluréia |
| Elisa | Do inglês <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| EMEA | Do inglês <i>European Medicines Agency</i> |
| ESA | Do inglês <i>Equine Serum Albumin</i> |
| F(ab´) | Do inglês <i>Fragment of antigen binding</i> (monovalente) |
| F(ab´) ₂ | Do inglês <i>Fragment of antigen binding</i> (bivalente) |
| F.B. | Farmacopéia Brasileira |

| | |
|-----------------|--|
| F _c | Fração cristalizável da imunoglobulina |
| F.E. | Farmacopéia Européia |
| Fmoc | Grupo Fluorenilmetoxicarbonil |
| FmocAA | Aminoácido protegido pelo grupo Fmoc |
| FR | Do inglês <i>Framework Region 1-4</i> |
| F _v | Fração variável da imunoglobulina |
| Funed | Fundação Ezequiel Dias, de Belo Horizonte MG. |
| IB | Instituto Butantan, São Paulo SP. |
| IBEX | Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro. |
| ICP | Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica. |
| IEF | Do inglês <i>isoelectric focusing</i> |
| IgGn | Isotipos (n de 1-7), da IgG eqüina, segundo a nomenclatura contemporânea. |
| IgGa | Isotipo a da IgG equina, segundo a nomenclatura tradicional. |
| IgGb | Isotipo b da IgG eqüina, segundo a nomenclatura tradicional. |
| IgGc | Isotipo c da IgG eqüina, segundo a nomenclatura tradicional. |
| IgG(T) | Isotipo T da IgG eqüina, segundo a nomenclatura tradicional. |
| IGHGn | Genes correspondentes a região constante dos isotipos (n de 1-7), da cadeia pesada da IgG eqüina |
| IOC | Instituto Oswaldo Cruz |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| INS | Instituto Nacional de la Salud, de Bogotá, Colômbia. |
| IPG | Do inglês <i>immobilized pH gradient</i> |
| IQUEGO | Indústria Química do Estado de Goiás, Goiânia GO |
| IVB | Instituto Vital Brasil, Niterói RJ |
| KLH | Do inglês <i>Keyhole limpet haemocyanin</i> |
| LCCDMA | Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos. |
| MALDI TOF | Do inglês <i>Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i> |
| MBS | Do inglês <i>3-maleimido benzoic acid</i> |
| MH ⁺ | Peptídeo monoprotonado |
| M.S. | Ministério da Saúde |
| m/z | Razão massa carga |

| | |
|------------------|--|
| NCBI | Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| N.I. | Não informado |
| NHS | N-hidroxisuccinimida |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PASNI | Programa de Auto-insuficiência Nacional em Imunobiológicos |
| PAGE | Gel de poliacrilamida |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PBS-TWEEN | Tampão fosfato salino acrescido de Tween |
| PDB | Do inglês <i>Protein Data Bank</i> |
| PI | Ponto isoelétrico |
| PLA ₂ | Fosfolipase A ₂ |
| PM | Peso molecular |
| PMF | Do inglês <i>Peptide Mass Fingerprint</i> |
| PNI | Programa Nacional de Imunizações |
| PNPP | Para-nitro-fenol-fosfato |
| PS | Peptídeo Sintético |
| PVDF | Difluoreto de polivinila |
| R _f | Fator de retenção |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| SA | Sulfato de amônio |
| SAB | Soro antibotrópico |
| SABC | Soro antibotrópico crotálico |
| SABL | Soro antibotrópico laquélico |
| SAC | Soro anticrotálico |
| SAE | Soro antielapídico |
| SAIMR | South Africa Institute of Medical Research, Sandringham, África do Sul |
| SAL | Soro antilaquélico |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato sódio. |
| SES | Secretarias Estaduais de Saúde |
| T.C. | Tempo de coagulação |
| TFA | Ácido trifluoracético |

| | |
|----------------|--|
| TOF | Do inglês <i>Time of flight</i> |
| TRC | Thai Red Cross Institute, de Bangkok, Tailândia |
| TT | Toxóide tetânico |
| TT-PS | Conjugado toxóide tetânico peptídeo sintético |
| UV-Vis | Espectroscopia no ultravioleta e visível. |
| USP | Do inglês <i>United States Pharmacopoeia</i> |
| V _H | Região variável da cadeia pesada da imunoglobulina |
| V _L | Região variável da cadeia leve da imunoglobulina |
| WHO | Do inglês <i>World Health Organization</i> |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 01: | Características anatômicas dos gêneros de ofídios de interesse médico do Brasil. | 5 |
| Figura 02: | Exemplos dos principais ofídios utilizados para a produção de soros no Brasil. | 6 |
| Figura 03: | Esquema da estrutura de imunoglobulinas. | 13 |
| Figura 04: | Produção de soros antiofídicos segundo protocolo adotado no Instituto Clodomiro Picado, San Jose, Costa Rica. | 18 |
| Figura 05: | Hidrólise de imunoglobulinas por proteases. | 22 |
| Figura 06: | Resumo do processo de produção dos soros antiofídicos preparados no Brasil | 23 |
| Figura 07: | Uso dos soros antiofídicos no Brasil no ano de 2006 | 37 |
| Figura 08: | Esquema da distribuição de soros antiofídicos no Brasil. | 38 |
| Figura 09: | Distribuição dos acidentes ofídicos nas regiões geográficas do Brasil no ano de 2006 | 39 |
| Figura 10: | Exemplos dos efeitos do veneno sobre as vítimas de acidentes ofídicos que não receberam tratamento adequado | 41 |
| Figura 11: | Paciente acometido pelo mal do soro | 44 |
| Figura 12: | Análises de SDS-PAGE (10%) em condições não-redutoras dos soros antiofídicos nacionais | 67 |
| Figura 13: | O teor de proteínas e teor de F(ab') ₂ dos SAB analisados. | 69 |
| Figura 14: | Preparo de padrão de ESA a partir do plasma eqüino | 72 |
| Figura 15: | Gel de padrões de ESA e pepsina | 73 |
| Figura 16: | Análises de SDS-PAGE (12%) em condições redutoras dos soros antiofídicos nacionais | 75 |
| Figura 17: | Immunoblot de lotes de SABs em condições não redutoras. | 76 |
| Figura 18: | Géis bidimensionais dos produtores (A), (B) e (C). | 79 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 19: | Spots assinalados para a determinação de PI e PM do gel mostrado na figura 18b | 81 |
| Figura 20: | Comparação entre os géis bidimensionais mostrados na figura 19 | 82 |
| Figura 21: | Ampliação de cerca de quatro vezes da região 2 do gel mostrado na figura 18(b) | 83 |
| Figura 22: | Ampliação de cerca de quatro vezes da região 4 do gel mostrado na figura 18(b) | 85 |
| Figura 23: | Estrutura tridimensional da ESA. | 88 |
| Figura 24: | Seqüência da ESA. | 89 |
| Figura 25: | Exemplos dos arranjos espaciais de epítomos em proteínas | 96 |
| Figura 26: | Seqüência do isotipo IgG3 eqüino | 96 |
| Figura 27: | Distribuição dos resíduos antigênicos do isotipo IgG3 pela escala de Jameson-Wolf | 97 |
| Figura 28: | Distribuição de resíduos antigênicos no isotipo IgG3 pela escala de Kolaskar. | 98 |
| Figura 29: | Distribuição de resíduos antigênicos no isotipo IgG3 pela escala Bepipred. | 99 |
| Figura 30: | Alinhamento das regiões constantes das cadeias pesadas das imunoglobulinas eqüinas com a região constante da cadeia pesada da imunoglobulina do coelho | 102 |
| Figura 31: | Alinhamento usado na modelagem molecular da cadeia pesada da IgG3 eqüina. | 104 |
| Figura 32: | Gráfico de Ramachandran da estrutura do modelo gerado para IgG3 eqüina | 104 |
| Figura 33: | Modelo da estrutura tridimensional da cadeia pesada do isotipo IgG3 da imunoglobulina eqüina | 105 |
| Figura 34: | Peptídeos sintetizados a partir da seqüência do isotipo IgG3 da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina. | 108 |
| Figura 35: | Membrana resultante do mapeamento de epítomos da IgG3 eqüina | 110 |
| Figura 36: | Curva de densitometria dos spots mostrados na figura 35 | 110 |
| Figura 37: | Alinhamento de seqüências dos spots reativos, para a determinação dos epítomos reconhecidos pelo soro policlonal. | 112 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 38: | Distribuição de epítomos na seqüência da IgG3 | 113 |
| Figura 39: | Vista dos três principais epítomos no modelo da IgG3 eqüina. | 115 |
| Figura 40: | Resultado do planejamento fatorial aplicado à otimização das condições de ELISA | 117 |
| Figura 41: | Comparação entre o epítopo sete e o peptídeo sintético usado em ELISA de competição | 117 |
| Figura 42: | Elisa de competição entre o soro comercial conjugado a fosfatase alcalina e o PS | 118 |
| Figura 43: | Curva de distribuição de peso molecular da coluna TSK SWXL 3000 | 120 |
| Figura 44: | Uso da CLAE no acompanhamento do processo de conjugação TT-PS | 121 |
| Figura 45: | Formação de conjugados cruzados entre o conjugado TT e o PS | 122 |
| Figura 46: | Possibilidades de conjugação com o MBS. | 123 |
| Figura 47: | Elisa para a determinação do título do soro de coelhos imunizados com o conjugado | 124 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1: | Ofídios utilizados na obtenção de venenos para a produção de soros no Brasil. | 4 |
| Tabela 2: | Exemplos de componentes dos venenos de serpentes usadas na produção de soros no Brasil | 9 |
| Tabela 3: | Composição de antígenos que deverão ser usados na produção de soros no Brasil. | 10 |
| Tabela 4: | Principais animais utilizados na produção de soros antiofídicos, de acordo com o país | 13 |
| Tabela 5: | Nomenclatura e características das imunoglobulinas eqüinas, de acordo com a região constante da cadeia pesada. | 14 |
| Tabela 6: | Ensaio e especificações para soros antiofídicos da F.E. V Ed. e da F.B. IV Ed. | 33 |
| Tabela 7: | Produtores de soros antiofídicos para uso humano no Brasil | 36 |
| Tabela 8: | Características clínicas e tratamento dos envenenamentos por serpentes brasileiras. | 40 |
| Tabela 9: | Efeitos adversos observados em soros antiofídicos produzidos no Brasil | 42 |
| Tabela 10: | Incidência de reações precoces a soros antiofídicos em estudos clínicos feitos fora do Brasil. | 43 |
| Tabela 11 | Esquema de imunização dos coelhos com o conjugado Peptídeo sintético – Toxóide Tetânico | 61 |
| Tabela 12 | Teor de proteínas nos Soros Brasileiros e de produtores de outros países | 65 |
| Tabela 13 | Peso molecular e teor relativo das bandas dos géis mostrados na figura 12 | 68 |
| Tabela 14 | Comparação dos teores relativos de $F(ab')_2/F(ab')$ com os dados da literatura | 70 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 15 | PM e teores relativos das bandas dos géis mostrados na figura 16 | 74 |
| Tabela 16 | Comparação entre os percentuais de IgG (banda A) e F(ab') ₂ (banda B) nos soros antiofídicos, encontrados por SDS-PAGE e immunoblot. | 77 |
| Tabela 17 | Comparação dos teores relativos de IgG com os dados da literatura. | 77 |
| Tabela 18 | Assinalação de bandas do gel B da figura 19. | 81 |
| Tabela 19 | Identificação dos spots 01, 02 e 03 pelo programa MASCOT. | 84 |
| Tabela 20 | Picos encontrados nos espectros de massas dos spots 1, 2 e 3 que tiveram massa molecular semelhante à de peptídeos da albumina de asno. | 84 |
| Tabela 21 | Identificação dos spots 29, 30, 31 e 32 pelo programa Protein Prospector | 86 |
| Tabela 22 | Picos encontrados nos espectros de massas dos spots 29, 30, 31 e 32 com peso molecular semelhante ao de peptídeos da ESA | 86 |
| Tabela 23 | Identificação do spot 40 pelo programa MASCOT | 87 |
| Tabela 24 | Picos encontrados nos espectros de massas do spot 40 com peso molecular semelhante ao de peptídeos da ESA | 87 |
| Tabela 25 | Teor de ESA residual nos soros Brasileiros e de produtores de outros países | 89 |
| Tabela 26 | Identificação dos spots 33, 34, 35, 36, 37 e 38 pelo programa MASCOT | 90 |
| Tabela 27 | Picos encontrados nos espectros de massas dos hidrolisados tripticos dos spots 33, 34, 35, 36, 37 e 38, que apresentaram semelhança a peptídeos de proteínas identificadas nesses spots | 90 |
| Tabela 28 | Epítomos previstos para o isotipo IgG3, pela escala de Jameson-Wolf | 97 |
| Tabela 29 | Epítomos presentes no isotipo da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina, pela escala de Kolaskar. | 98 |
| Tabela 30 | Epítomos presentes no isotipo da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina, pela escala Bepipred. | 99 |
| Tabela 31 | Consolidação dos resultados da predição de epítomos a partir da seqüência primária da IgG3. | 100 |
| Tabela 32 | Consolidação dos resultados da predição de epítomos da seqüência IgG3. | 106 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Tabela 33 | Número e seqüências dos spots com D.O. mais intensas, mostrados na figura 35 | 111 |
| Tabela 34 | Epítomos lineares presentes na IgG3 eqüina. | 113 |
| Tabela 35 | Comparação dos resultados da predição com os resultados de mapeamentos de epítomos | 114 |
| Tabela 36 | Características dos picos do cromatograma do TT e do cromatograma do produto da reação de conjugação entre o TT e o PS | 120 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 – Introdução | 1 |
| 1.1 – Histórico | 1 |
| 1.2 – Tecnologia de produção de soros antiofídicos | 2 |
| 1.2.1 – Ofídios usados na produção de soros | 3 |
| 1.2.2 – Venenos | 7 |
| 1.2.3 – Animais soro produtores | 11 |
| 1.2.4 – Preparo do Imunizante | 11 |
| 1.2.5 – Imunização dos Animais | 12 |
| 1.2.6 – Purificação do Plasma Hiperimune | 15 |
| 1.2.6.1 – Purificação por Precipitação Seletiva | 16 |
| 1.2.6.1.1 – Precipitação Salina | 16 |
| 1.2.6.1.2 – Precipitação por Ácidos Orgânicos | 17 |
| 1.2.6.2 – Purificação utilizando Hidrólise Enzimática | 18 |
| 1.2.6.3 – Purificação por Cromatografia | 24 |
| 1.2.6.3.1 – Purificação por cromatografia de troca iônica | 24 |
| 1.2.6.3.2 – Purificação por cromatografia de afinidade | 25 |
| 1.2.7 – Formulação dos soros antiofídicos | 27 |
| 1.2.8 – Controle de Qualidade de soros antiofídicos | 29 |
| 1.2.8.1 – Normatização da qualidade de soros antiofídicos | 29 |
| 1.2.8.2 – Ensaio aplicados no controle de qualidade dos soros antiofídicos | 31 |
| 1.2.8.2.1 – Farmacopéia Européia VI Edição (F.E. VI ed) | 32 |
| 1.2.8.2.2 – Farmacopéia Brasileira IV Edição (F.E. VI ed) | 32 |
| 1.3 – Soros Antiofídicos no Brasil | 34 |
| 1.3.1 – Fabricação e distribuição dos soros antiofídicos no Brasil | 34 |

| | |
|--|----|
| 1.3.2 – Epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil | 38 |
| 1.3.3 – Uso clínico dos soros antiofídicos | 39 |
| 1.3.4 – Efeitos adversos ao uso dos soros | 41 |
| 1.3.4.1 – Efeitos precoces | 41 |
| 1.3.4.2 – Efeitos tardios | 44 |
| 2 – Objetivos | 45 |
| 2.1 – Objetivo geral do trabalho | 45 |
| 2.2. – Objetivos específicos | 45 |
| 3 – Metodologia | 46 |
| 3.1 – Locais de execução dos experimentos | 46 |
| 3.2 – Material | 46 |
| 3.2.1 – Amostras | 46 |
| 3.2.2 – Animais | 47 |
| 3.2.3 – Reagentes | 47 |
| 3.3 – Métodos | 47 |
| 3.3.1 – Determinação quantitativa de proteínas | 47 |
| 3.3.2 – Eletroforese em SDS-PAGE | 48 |
| 3.3.3 – Cromatografia de afinidade por Cibacron Blue F3G-A | 48 |
| 3.3.4 – Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa das frações coletadas da coluna Cibacron Blue | 49 |
| 3.3.5 – Immunoblot | 49 |
| 3.3.6 – Eletroforese Bidimensional | 50 |
| 3.3.7 – Digestão enzimática dos spots | 51 |
| 3.3.8 – Espectrometria de massas | 52 |
| 3.3.9 – Identificação dos spots | 52 |
| 3.3.10 – Predição de epítomos a partir da estrutura primária de proteínas | 53 |
| 3.3.11 – Alinhamento de seqüências | 56 |
| 3.3.12 – Modelagem Molecular por homologia | 56 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.13 – Mapeamento de epítomos por spot síntese de peptídeos | 57 |
| 3.3.14 – Preparo de conjugados TT-PS | 59 |
| 3.3.15 – Avaliação do conjugado TT-PS por CLAE | 60 |
| 3.3.16 – Imunização dos coelhos com o conjugado TT-PS | 61 |
| 3.3.17 – Elisa | 62 |
| 4 – Resultados | 64 |
| 4.1 – Avaliação da pureza de Soros Antiofídicos | 64 |
| 4.1.1 – Teor de Proteínas | 64 |
| 4.1.2 – Determinação do Teor de F(ab') ₂ | 66 |
| 4.1.3 – Avaliação dos Contaminantes | 71 |
| 4.1.4 – Identificação dos contaminantes | 76 |
| 4.1.4.1 – Immunoblot | 76 |
| 4.1.4.2 – Eletroforese Bidimensional | 78 |
| 4.1.4.3 – Identificação dos Spots | 83 |
| 4.1.4.3.1 – Região 3 | 83 |
| 4.1.4.3.2 – Região 4 | 85 |
| 4.2 – Preparo de anticorpos para a Detecção de IgG em Soros Antiofídicos | 92 |
| 4.2.1 – Predição de Epítomos da Cadeia Pesada de IgG eqüina | 95 |
| 4.2.1.1 – Predição a partir da Estrutura Primária | 97 |
| 4.2.1.1.1 – Predição pela Escala de Jameson Wolf | 97 |
| 4.2.1.1.2 – Predição pela Escala de Kolaskar | 98 |
| 4.2.1.1.3 – Predição pela Escala Bepipred | 99 |
| 4.2.1.1.4 – Comparação de Predições Baseadas na Estrutura Primária | 100 |
| 4.2.1.2 – Alinhamento das seqüências das cadeias pesadas eqüinas com a cadeia pesada do coelho | 101 |
| 4.2.1.3 – Modelagem por Homologia da cadeia pesada do isotipo IgG3 | 103 |
| 4.2.2 – Determinação de Epítomos Lineares da IgG3 por spot síntese | 107 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.3 – Confirmação do epítopo sete por Elisa | 116 |
| 4.2.4 – Preparo dos Anticorpos Contra o epítopo sete | 119 |
| 4.2.4.1 – Preparo do antígeno para imunização dos animais | 119 |
| 4.2.4.2 – Imunização dos animais | 124 |
| 5 – Discussão | 126 |
| 5.1 – Avaliações da Pureza de Soros Antiofídicos | 126 |
| 5.2 – Preparo de Anticorpos para a Detecção de IgG em Soros Antiofídicos | 129 |
| 6 – Conclusão | 134 |
| 7 – Bibliografia | 139 |

1 – Introdução

1.1 – Histórico

Desde os primórdios da humanidade o contato do homem com animais venenosos acontece. Durante a maior parte da história as vítimas desse agravo não tiveram a possibilidade de um tratamento adequado, levando-as a lesões e morte. No Brasil, durante o período colonial e a monarquia, os acidentes ofídicos eram considerados uma praga, com elevada incidência e mortalidade (SAÚDE, 2008; BOCHNER, 2003).

Essa situação começou a mudar a pouco mais de cem anos. O primeiro marco deu-se com a produção de soros antiofídicos na França em 1894, graças à aplicação do conhecimento de que a inoculação de toxinas bacterianas em animais produzia no plasma um princípio capaz de neutralizar o efeito da toxina (WAGNER, 2006).

Albert Calmette, pesquisador do Instituto Pasteur e Césaire Auguste Phisalix, do Museu de História Natural de Paris, em trabalhos independentes, utilizaram-se da mesma metodologia para preparar o soro contra o veneno de naja (BOCHNER & STRUCHINER, 2003).

No âmbito nacional, a tecnologia de produção de soros antiofídicos e o seu uso para o tratamento dos acidentes ofídicos foi introduzida pelo médico Vital Brasil, no princípio do século XX (BOCHNER, 2003).

Já se passara mais de um século desde o primeiro uso do soro antiofídico e, apesar disso, este é ainda o único produto farmacêutico disponível para o tratamento de envenenamento por cobras. Fazendo uma retrospectiva, percebe-se claramente que foi feito muito pouco investimento em pesquisa e desenvolvimento de produtos destinados ao tratamento de envenenamento por cobras. Recentemente algumas alternativas estão sendo pesquisadas, como o uso de anticorpos monoclonais (HARRISON et al, 2003) e anticorpos monoclonais humanizados, mais esses produtos ainda estão longe de uma aplicação clínica.

No Brasil esses produtos são particularmente importantes para a população rural, a mais exposta ao contato com ofídios. A incidência desses acidentes é de mais de vinte mil casos/ano, levando a cerca de cem óbitos/ano (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2008). Em função disso, pode-se inferir que sem os soros a mortalidade e mutilações seriam bem maiores.

1.2 – Tecnologia de Produção de Soros Antiofídicos

A legislação vigente, Resolução nº 174 da secretaria de Vigilância Sanitária, de 11 de novembro de 1996, define soro antiofídico como sendo “... uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de eqüídeos hiperimunizados, contra o veneno da serpente a que se refere”(BRASIL, 1996). Segundo essa definição, fica claro que os soros ainda são produzidos de acordo com a idéia original de Calmette e Phisalix, ressaltando no entanto, que ao longo desse período muitos avanços tecnológicos foram incorporandos ao processo de produção dos soros.

Cabe ressaltar que os soros antiofídicos são medicamentos, mais especificamente produtos biológicos, e como tal estão sujeitos em parte às legislações que cobrem os produtos farmacêuticos. Por exemplo, a sua produção é regulamentada pela mesma Resolução da ANVISA aplicada aos medicamentos - RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Essa resolução dita as Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 2003). Como a produção de soros antiofídicos envolve a utilização de material biológico, intrinsecamente variável, o cumprimento das BPF na produção dos soros é ainda mais crítico que em outros produtos farmacêuticos.

A produção de soros antiofídicos é um processo complexo, porque faz uso de material biológico e envolve inúmeras etapas. As principais etapas são: a criação e manejo de animais, para a coleta de venenos e posterior obtenção do plasma hiperimmune, tecnologia de processos bioquímicos para o fracionamento do plasma hiperimmune e tecnologia farmacêutica para a formulação e envase do produto final (LALLOO & THEAKSTON, 2003; BURNOUF et al, 2004).

Na primeira etapa do processo de produção de soros são necessárias as serpentes, para a obtenção dos venenos, que serão usados para a imunização de animais soros produtores. A imunização poderá ser feita utilizando o veneno de espécies de um único gênero, dando origem a um soro monovalente, ou a mistura de venenos de espécies de dois gêneros diferentes, dando origem a soros polivalentes.

Após a imunização, o plasma de vários animais é reunido dando origem ao plasma acabado a granel, que será processado para a purificação da fração ativa, originando o soro concentrado a granel. Na etapa de tecnologia

farmacêutica o soro concentrado será formulado, gerando o soro acabado a granel que será então envasado em ampolas sob condições assépticas.

Cada uma dessas etapas tem muitas particularidades que influenciam na eficácia e segurança dos produtos. Por esse motivo, essas etapas serão discutidas de forma detalhada.

1.2.1 – Ofídios Usados na Produção de Soros

As serpentes utilizadas para a obtenção dos venenos são capturadas na natureza e encaminhadas para serpentários, que as mantêm e eventualmente as reproduzem. No caso de animais capturados, deve ser registrado o local da captura, a cobra deve ser submetida a classificação taxonômica e deverá ser mantida em quarentena antes do início do uso de seu veneno em produção (BRASIL, 1996).

Uma alternativa à captura e manutenção de cobras venenosas consiste na produção de componentes do veneno por meio de tecnologia de DNA recombinante. Deve-se destacar que essa alternativa se encontra em pesquisa, não sendo ainda empregada em produção (LALLOO & THEAKSTON, 2003).

No Brasil, os gêneros de ofídios mais importantes do ponto de vista médico são *Bothrops*, *Crotallus*, *Lachesis* e *Elapidea*. Cada um desses gêneros tem várias espécies de interesse para a saúde pública, daí a legislação preconizar a utilização de venenos de algumas espécies na produção de soros, garantindo uma maior cobertura da proteção contra o envenenamento por gênero.

O gênero *Bothrops* é constituído por serpentes popularmente chamadas de jararacas. Esse gênero tem o maior número de espécies de interesse médico no Brasil, sendo responsável também pelo maior número de acidentes. Cada uma das espécies de *Bothrops* tem uma distribuição geográfica específica (Tabela 1), sendo que em todas as regiões do território nacional há pelo menos uma espécie presente. As espécies desse gênero têm uma cabeça em formato triangular (fig. 1a), com narinas, fosseta loreal, dentes inoculadores de grande tamanho (fig. 1b) e calda lisa (fig. 1c). O tegumento desses animais tem uma coloração característica, como mostrado na figura 2a.

Apenas uma espécie do gênero *Crotalus* (cascavel) é usada na produção de soro antiofídicos no Brasil. Esta espécie apresenta uma distribuição geográfica mais específica, ocorrendo principalmente em áreas de

campos, em boa parte do centro do território nacional (Tabela 01). Uma característica anatômica marcante dessa serpente é a presença de chocalho na ponta da calda (fig. 1d), além do tegumento (fig. 2b).

As maiores serpentes venenosas brasileiras pertencem ao gênero *Lachesis* (surucucus) podendo atingir até 3,5 metros de comprimento. Outro aspecto próprio desse gênero é o formato da calda, com as escamas eriçadas (fig. 1e). Duas espécies de relevância para saúde são presentes no território nacional, ocorrendo em florestas úmidas, como manchas de mata atlântica no litoral do SE até o NE (*Lachesis muta muta*) e na floresta Amazônica (*Lachesis muta rombeata*) (Tabela 01) (MELGAREJO, 1997).

A família *Elapidea* (corais) tem duas espécies de interesse médico no Brasil. São encontrados no S, SE e CO do país (Tabela 1). Seu formato de cabeça é bastante diferente dos demais gêneros, não apresentando a fosseta loreal (fig 1f). Os dentes de inoculação são pequenos, fixos e situados na parte anterior da boca (fig 1g) e padronagem do tegumento bem diferente dos demais ofídios nacionais (fig 2d).

Tabela 1: Ofídios utilizados na obtenção de venenos para a produção de soros no Brasil

| Família/Gênero | Nome popular ⁽¹⁾ | Espécies | Distribuição geográfica |
|---------------------------|-----------------------------|--|---|
| <i>Viperidea/Bothrops</i> | Jararaca | <i>B. jararaca</i> | S, SE, Sul da Bahia e MS |
| | | <i>B. jararacussu</i> | S, SE e parte MS |
| | | <i>B. alternatus</i> | Amazônia legal |
| | | <i>B. moojeni</i> | SE, CO e NE |
| | | <i>B. neuwiedi</i> | Campos no centro do país |
| | | <i>B. cotiara</i> | SE e S |
| <i>Viperidea/Crotalus</i> | Cascavel | <i>C. dirissus</i> <i>terrificus</i> | Campos (S,SE, CO e NE) |
| <i>Viperidea/Lachesis</i> | Surucucu | <i>L. muta muta</i> <i>L. m. rombeata</i> | Manchas de mata atlântica (NE e SE) Amazônia |
| <i>Elapidea/ Micrurus</i> | Coral | <i>Micrurus frontalis</i> <i>Micrurus coralinus</i> | S e SE S, SE e CO |

(1) Outras denominações populares são comuns nas diversas regiões do país.

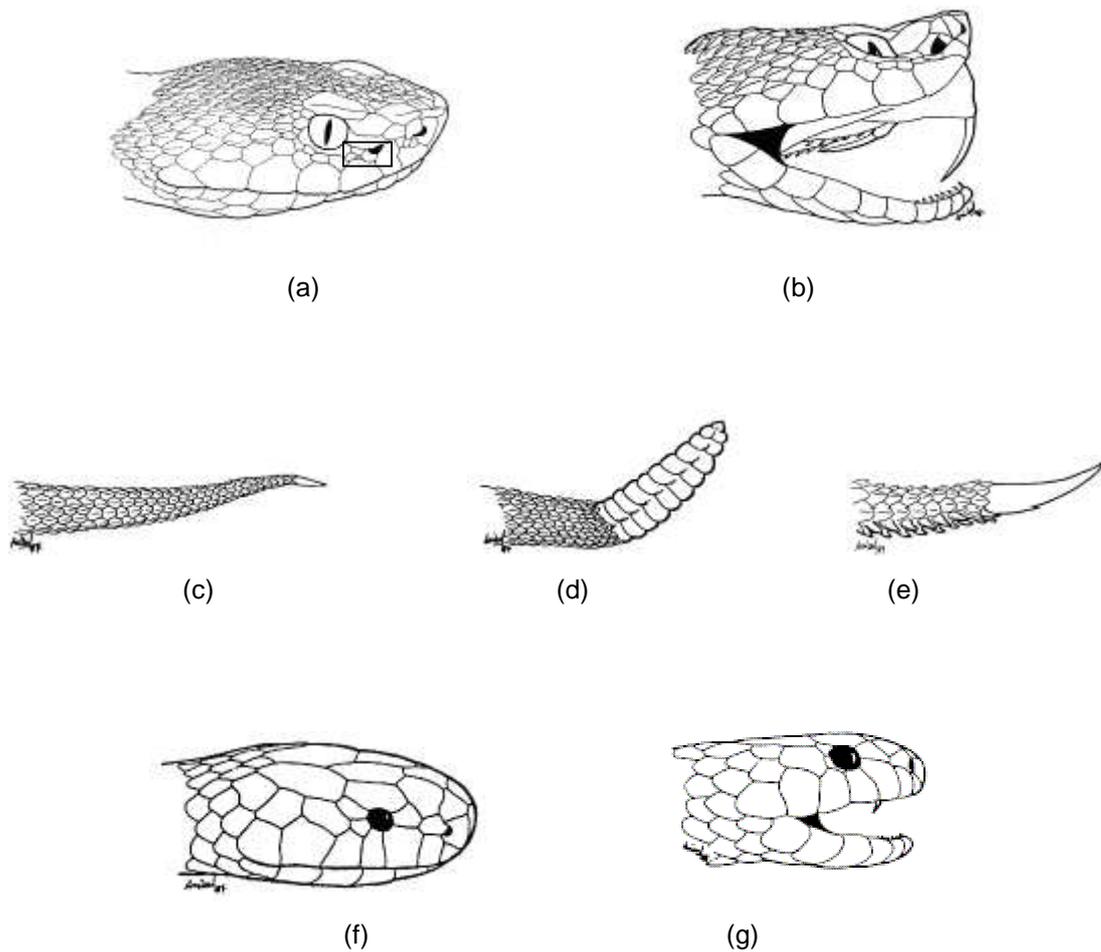


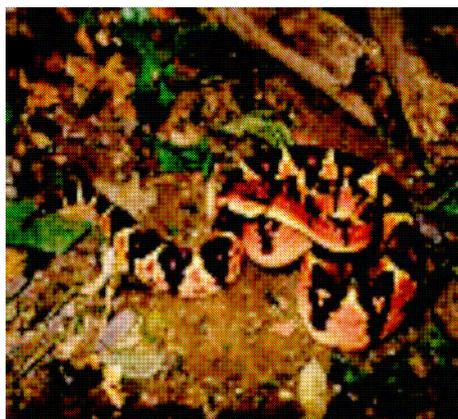
Figura 01: Características anatômicas dos gêneros de ofídios de interesse médico do Brasil (a) cabeça com fosseta loreal (no quadro) de *Bothrops*, *Crotallus* e *Lachesis*. (b) dentes inoculadores de grande porte e localizados na porção anterior do maxilar. (c) calda lisa (*Bothrops*) (d) calda com chocalho (*Crotallus*) (e) Calda com escamas eriçadas (*Lachesis*) (f) cabeça sem fosseta loreal, de *Elapidea* (g) dentes inoculadores pequenos e fixos localizados na região posterior da boca. (BRASIL, 2001).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2: Exemplos dos principais ofídios utilizados para a produção de soros no Brasil. (a) *Bothrops jararaca* (b) *Crotallus durissus* (c) *Lachesis Muta* (d) *Micrurus carallinus*. (BRASIL, 2001)

1.2.2 – Venenos

Venenos de serpentes são a secreção de glândulas especializadas, presentes nesses animais. As espécies de interesse médico apresentam uma comunicação da glândula com dentes especializados na inoculação do veneno na vítima.

A composição química dos venenos já foi bastante estudada. Os venenos são misturas complexas de proteínas, glicoproteínas e peptídeos, além de outros componentes de baixo peso molecular, como serotonina, histamina (VARANDA & GIANNINI, 1999) e componentes destituídos de efeito tóxico, como citrato (OWNBY et al, 1999a), íons sódio e potássio.

A maioria das proteínas presentes nos venenos são enzimas, sendo que a presença de proteases é muito comum. Estudos sobre a composição dos venenos já demonstraram a presença de metalo (FOX et al, 1994) e serino proteases (DE SIMONE et al, 1996; DE SIMONE et al, 2007). De acordo com sua especificidade para substratos, as proteases de venenos podem ser classificadas como específicas e inespecíficas. (ZINGALI et al, 2001).

Proteases específicas atuam principalmente sobre proteínas da cascata de coagulação, tendo efeito anticoagulante (DE SIMONE et al, 2007). Por exemplo, a batroxobina, uma serino protease com ação similar a trombina isolada do veneno de *B. moojeni*, é utilizada para o tratamento de pacientes com trombos sanguíneos (GEYER, 1995).

As proteases inespecíficas são um grupo bem maior e heterogêneo de enzimas, envolvendo principalmente metalo proteases dependentes de zinco. Essas enzimas causam hemorragias e lesões nos tecidos das vítimas (FOX et al, 1994).

Outro tipo de enzima comum aos venenos é a fosfolipase A₂ (PLA₂). Essas enzimas hidrolisam fosfolipídios da membrana celular, liberando os ácidos graxos da posição 2 e os monoacil fosfo gliceróis (DENNIS & SIX, 2000).

As PLA₂ de veneno são classificadas de acordo com a estrutura de seu sítio ativo, em K₄₉ (possuem uma lisina na posição 49 da cadeia), D₄₉ (quando tem na posição 49 um aspartato) e S₄₉ (serina na posição 49), sendo essa última muito pouco freqüente (OWNBY, 1999b). Nas enzimas K₄₉ a presença da lisina confere uma carga positiva ao sítio ativo. As enzimas D₄₉ e S₄₉ ligam

um íon Ca^{+2} no sítio ativo, que também confere a carga positiva. Os isotipos K_{49} e S_{49} têm uma cinética de hidrólise de fosfolípidos muito mais lenta que D_{49} . Apesar dessa diferença, seus efeitos tóxicos também são pronunciados (LOMONTE, 2003).

De acordo com seu efeito sobre a vítima as PLA_2 são classificadas em miotoxinas e miotoxinas-neurotoxinas (bloqueiam o funcionamento de sinapses). As miotoxinas são proteínas de peso molecular menor (cerca de 120 aminoácidos na cadeia), e provocam lise das células musculares (efeito miotóxico). Predominam nessa classe as enzimas K_{49} e S_{49} . As indutoras de edema tem PM semelhante e produzem o inchaço característico do local da mordida. Predominam nesse caso as enzimas D_{49} (LOMONTE et al, 2003).

Neurotoxinas também são bastante comuns em venenos de *Elapidea* e *Crotallus*. Elas têm um peso molecular semelhante as PLA_2 anteriores, sendo que além da atividade fosfolipase, atuam bloqueando neurônios pré-sinapse em junções neuro musculares. Esse efeito leva a paralisia na vítima (LOMONTE et al, 2003).

Outras atividades enzimáticas também já foram descritas nos venenos, como hidrolases de ácidos nucleicos, oxidases de aminoácidos e esterasas (ZINGALI et al, 2001; SERRANO et al, 2006).

Fora as neurotoxinas, algumas outras proteínas presentes no veneno não tem atividade enzimática. As Lecitinas, proteínas com capacidade de ligação de açúcares, são um exemplo dessa classe de componente de venenos (DE SIMONE et al, 2006).

Os peptídeos bioativos têm uma importância grande em venenos. Alguns peptídeos têm a atividade miotóxica semelhante a PLA_2 (LOMONTE, 2003). Outros atuam inibindo enzimas plasmáticas da vítima, provocando a queda da pressão arterial. O estudo desse efeito de peptídeos de *Bothrops jararaca* levou ao desenvolvimento do captopril, primeiro anti-hipertensivo da classe de inibidores da enzima conversora de angiotensina (SELLS, 2003).

É importante destacar que a ocorrência de cada um desses componentes varia bastante de espécie para espécie. Na Tabela 02 são mostrados os alguns componentes dos venenos dos gêneros de serpentes utilizadas na produção dos soros brasileiros.

Tabela 2: Exemplos de componentes dos venenos de serpentes usadas na produção de soros no Brasil

| Gêneros | Componentes |
|-----------------|---|
| <i>Bothrops</i> | Metalo proteases (HARRISON et al, 2003) |
| | Serino proteases (DE SIMONE et al, 2007) |
| | PLA ₂ .(SILVA et al, 2001) |
| | Oxidase de aminoácidos (SERRANO et al, 2005) |
| | Hidrolase de ácidos nucléicos (SERRANO et al, 2005) |
| | Lectinas (DE SIMONE et al, 2006) |
| | Peptídeos bioativos (DE SIMONE et al, 2001) |
| <i>Crotalus</i> | Atividade de várias proteases (PEREZ et al, 2001) |
| | PLA ₂ (LOMONTE et al, 2003) |
| | Neurotoxina (SANO-MARTINS et al, 2001) |
| <i>Micrurus</i> | PLA ₂ (ALAPE-GIRON et al, 1994) |
| | Neurotoxina (LOMONTE, 2003) |
| <i>Lachesis</i> | Metalo proteases (OLORTEGUI et al, 2006) |
| | Serino proteases (DE SIMONE et al, 1996) |
| | PLA ₂ (GUTIERREZ et al, 1998) |
| | Neurotoxina (MELGAREJO, 1997). |

A diversidade dos venenos não se resume às diferenças entre as espécies, mas também a indivíduos da mesma espécie; Idade (GUTIERREZ et al, 1991) e fatores ambientais (MORHY et al, 2002; RODRIGUES SIMIONI, 2004) podem acarretar diferenças na composição de seus venenos. Por esse motivo, para a imunização dos animais soro produtores é necessário preparar misturas de venenos de vários exemplares diferentes da mesma espécie de serpente, para que a mistura resultante apresente a maior composição de toxinas possível. Desta forma o soro produzido protegerá melhor a vítima do acidente.

Para a produção do soro específico para um gênero, além de misturar venenos de vários indivíduos da mesma espécie, é necessário misturar venenos das diferentes espécies. A Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996 estabelece as associações de venenos de diferentes espécies para a produção dos soros nacionais, conforme mostra a Tabela 3

Tabela 3: Composição de antígenos que deverão ser usados na produção de soros no Brasil (BRASIL, 1996)

| Soros | Espécies presentes no Brasil |
|---------------------|-------------------------------------|
| Antibotrópico (SAB) | <i>Bothrops jararaca</i> (50 %) |
| | <i>B. jararacussu</i> (12,5%) |
| | <i>B. alternatus</i> (12,5%) |
| | <i>B. moojeni</i> (12,5%) |
| | <i>B. neuwiedi</i> (12,5%) |
| Anticrotálico (SAC) | <i>Crotalus dirissus terrificus</i> |
| Antielaídico (SAE) | <i>Micrurus frontalis</i> (50%) |
| | <i>Micrurus coralinus</i> (50%) |
| Antilaquético (SAL) | <i>Lachesis muta</i> |

Além da composição, outro parâmetro importante para a imunização dos animais soro produtores é a quantidade de veneno obtido de cada serpente. Essa quantidade depende de alguns fatores, como a espécie, idade e peso do animal (MELGAREJO, 1997; NETTO, 2007).

Após a coleta do veneno este é submetido à centrifugação e subsequentemente à liofilização. Essas operações devem ser realizadas ao abrigo da luz e o armazenamento do veneno deve ser a -20°C, a fim de diminuir a degradação de seus componentes, consequentemente aumentando sua estabilidade.

Uma etapa preliminar ao preparo do imunizante é o controle do veneno que é titulado para certificar seu efeito tóxico. A dose letal (DL₅₀), deve ser determinada, para garantir que o soro produzido a partir da imunização com esse material terá um bom efeito protetor (BRASIL, 1996).

A presença de componentes específicos, importantes para a proteção contra os efeitos do veneno também deve ser avaliada. No caso do veneno Crotálico a presença da toxina crotalina deverá ser confirmada (BRASIL, 1996).

O fracionamento do veneno antes do preparo do imunizante também pode ser realizado (ABD-ELSALAM et al, 2007; RATANABANANGKOON & RAWEERITH, 2003). No Brasil, o principal objetivo desse procedimento é remover componentes do veneno que têm efeito imunossupressor, aumentando o título do soro formado. Esses componentes são encontrados nos venenos de *Bothrops jararacussu* (NETTO, 2007) e de *Lachesis* sp (HIGASHI et al, 2007).

1.2.3 – Animais Soro Produtores

Na produção de imunoglobulinas são utilizados animais de grande porte, que fornecem um volume grande de produto em cada ciclo de produção. As espécies utilizadas variam de acordo com o país, sendo mais utilizados o cavalo (*Equus caballus*) e o carneiro (*Ovis aries*). Na Tabela 4 são sumarizados os animais utilizados nos principais países produtores de soros antiofídicos do mundo (THEAKSON & WARRELL, 1991).

No Brasil, adotou-se o cavalo para a produção do soro antiofídico. Para o uso em produção de soros os cavalos devem ser inicialmente submetidos a um período de quarentena, para a verificação de suas condições sanitárias. O acompanhamento constante de um médico veterinário é necessário, e caso os animais precisem de algum tratamento, deverão ser retirados do plantel de produção (BRASIL, 1996).

Tabela 4: Principais animais utilizados na produção de soros antiofídicos, de acordo com o país (THEAKSON & WARRELL 1991; GUTIERREZ et al, 2007)

| País | Animal |
|---|---------|
| África do Sul, Brasil, Costa Rica, Estados Unidos, França, México | Cavalo |
| Austrália, Estados Unidos, Reino Unido | Ovelha |
| Tunísia | Camelo |
| Bolívia | Jumento |

1.2.4 – Preparo do Imunizante

A primeira etapa da imunização dos animais consiste no preparo do imunizante, ou seja, o veneno liofilizado é utilizado na preparação de uma formulação que será injetada nos animais soro produtores.

O preparo do imunizante pode começar pela detoxificação do veneno por agentes químicos, tipo inibidores enzimáticos (GLIGIO et al, 2004), agentes alquilantes como o glutaraldeído (GUIDOLIN et al, 1989) e quelantes, como o EDTA (HIGASHI, 1989). Esse procedimento diminui o efeito tóxico dos venenos sobre os animais soro produtores, preservando a sua saúde. A inativação do veneno por agentes físicos também pode ser usada; Um exemplo é o uso de radiações ionizantes (ROGERO & NASCIMENTO, 1997).

Apesar da inativação diminuir os efeitos do veneno sobre os animais soro produtores, alguns laboratórios não a realizam. Esse procedimento não é realizado porque ele pode inativar epítomos importantes, que promovem a formação de anticorpos protetores contra o efeito do veneno (GUTIERREZ et al, 1997).

A última etapa no preparo dos antígenos para imunização dos animais é a adição de adjuvantes que aumenta o título de anticorpos formados. Dentre os adjuvantes - o de Freund completo é utilizado na primeira imunização, enquanto o adjuvante de Freund incompleto na segunda imunização, e por fim o alginato de sódio nas imunizações subseqüentes (GUTIERREZ et al, 1997). O uso de adjuvante de Freund requer a aplicação de pequenas doses em vários pontos do animal, visto o cavalo é especialmente sensível aos efeitos locais desse produto (RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2005)

1.2.5 – Imunização dos animais

O esquema de imunização dos animais baseia-se na administração subcutânea de doses crescentes dos venenos. O esquema de imunização utilizado no Instituto Clodomiro Picado (ICP) (San Jose, Costa Rica), é o seguinte: 1,5 mg no primeiro dia, 3 mg no 14^o, 9 mg no 28^o, 18 mg no 42^o, 56 mg no 56^o, 45 mg no 70^o e 50 mg no 84^o. A coleta do sangue do animal imunizado só ocorre no 98^o dia que é então submetido a separação do plasma (GUTIERREZ et al, 1997). Esse mesmo esquema de imunização é utilizado no Uruguai (CHERONI, 1994).

A separação do plasma do sangue pode ser feita por dois processos, a coagulação ou a plasmaforese (BURNOUF et al, 2004), ou seja, separação do plasma e devolução das células sanguíneas para o animal. O segundo processo possibilita uma recuperação mais rápida dos animais soro produtores.

Os cavalos imunizados com veneno produzem um título elevado de imunoglobulinas do tipo IgG. As IgGs do cavalo, como na maioria dos demais mamíferos (WEIR, 1966a), são proteínas tetraméricas, compostas por duas cadeias de aproximadamente 25 kDa - denominadas de cadeias leves, e por outras duas cadeias de aproximadamente 50 kDa - denominadas de cadeias pesadas. A figura 3 mostra um esquema geral de estrutura de imunoglobulinas, com as quatro cadeias e os seus respectivos domínios.

A cadeia leve contém um domínio constante (C_L) e um domínio variável (V_L), este formado por recombinação de cadeias de DNA e destina-se ao reconhecimento dos antígenos. O V_L dessa cadeia está no N-terminal da molécula e sua estrutura terciária é estabilizada por pontes dissulfeto.

Foram descritos dois tipos de C_L no cavalo, κ e λ (GIBSON, 1974), sendo que a razão da ocorrência em imunoglobulinas plasmáticas é de treze unidades de λ para uma de κ (GIBSON et al, 1994). A cadeia λ apresenta 4 isotipos distintos, sendo que a similaridade entre eles é da ordem de 96% (GIBSON et al, 1992).

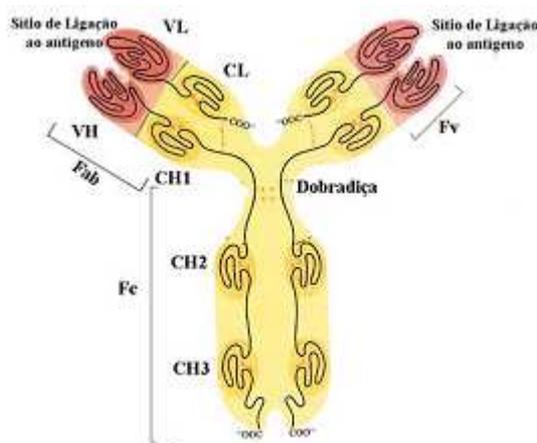


Figura 3: Esquema da estrutura de imunoglobulinas. São mostrados em amarelo os domínios constantes das duas cadeias (C_L , C_{H1} , dobradiça, C_{H2} e C_{H3}). Em vermelho são mostradas as porções variáveis das duas cadeias (V_L e V_H).

A cadeia pesada da imunoglobulina eqüina tem três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) e o domínio variável (V_H), também situado no N-terminal da molécula. A cadeia pesada tem uma região entre o primeiro e o segundo domínio constante conhecida como região da dobradiça. Essa região apresenta uma flexibilidade conformacional maior que os domínios constantes.

A estrutura terciária dos domínios constantes da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina é estabilizada por pontes dissulfeto (WEIR & PORTER, 1966a).

Inicialmente foram descritos quatro isotipos principais para a cadeia pesada das IgGs de cavalo, baseando-se em características bioquímicas, como peso molecular (KLINMAN et al, 1966), precipitação seletiva e afinidade por proteínas de bactérias, como a proteína A de *Staphilococcus*. Esses

isotipos foram denominados de IgGa, IgGb, IgGc e IgG(T) (ROCKEY, 1967). Essas moléculas podem ser separadas por precipitação seletiva e cromatografia, de acordo com suas de afinidades para diferentes ligantes (HOLMES & SHEORAN, 1996; SUGIURA et al , 2000). Apresentam diferenças também nas mobilidades eletroforéticas, conforme mostrado na Tabela 5. Nos soros antiofídicos produzidos no Brasil, predomina o isotipo IgG(T) (FERNANDES et al, 2000) sendo o título muito menor para os demais.

Estudos sobre a estrutura dos genes das regiões constantes da cadeia pesada do cavalo mostraram muita semelhança com a cadeia pesada de outros mamíferos (WAGNER et al, 1998), revelando inicialmente a existência de 6 genes para cadeia pesada de IgG (5'-c γ 1//c γ 2//c γ 3//c γ 4//c γ 5//c γ 6-3'). Esses genes já foram clonados e seqüenciados (WAGNER et al, 2004). A análise desses genes revelou a presença de mais um isotipo, totalizando sete para os domínios constantes da cadeia pesada de IgGs. A identidade entre os isotipos varia de 69% até 78% (WAGNER et al, 2002). A nomenclatura proposta para os isotipos da IgG eqüina é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5: Nomenclatura e características das imunoglobulinas eqüinas, de acordo com a região constante da cadeia pesada.(adaptada de WAGNER, 2006)

| Nome original | PM (SDS-PAGE) | Nome atual | Gene | Extensão (aa) | Gene Bank |
|---------------|---------------|------------|-------|---------------|-----------|
| IgGa | 170 kDa | IgG1 | IGHG1 | 337 | AJ302055 |
| | | IgG2 | IGHG2 | 330 | AJ302056 |
| IgG(T) | 159 kDa | IgG3 | IGHG3 | 354 | AY256910 |
| IgGb | 135 kDa | IgG4 | IGHG4 | 327 | AJ302057 |
| IgG(T) | 150 kDa | IgG5 | IGHG5 | 326 | AY312380 |
| | | IgG6 | IGHG6 | 329 | AJ312381 |
| IgGc | 180 kDa | IgG7 | IGHG7 | 328 | AJ302058 |

O repertório de linhagem germinativa do cavalo já foi em parte estudado. Já foram identificados 10 genes IGHV, 7 IGHD e 5 IGHJ (SCHRENZEL et al, 1997). No repertório da cadeia leve foram identificados 20 genes IGKV, 5 IGKJ (GIBSON et al, 1994), 30 IGLV e 3 IGLJ (GIBSON et al, 1992).

Diferente dos domínios constantes, que já foram bastante estudados, os domínios variáveis das imunoglobulinas eqüinas foram pouco estudados. Cerca de 60 V_H de eqüinos já foram seqüenciados, principalmente utilizando material de um animal que foi imunizado com o veneno do escorpião mexicano (ALMAGRO et al, 2006).

Nas seqüências do V_H eqüino foi observada uma grande conservação das porções que dão forma ao sítio de ligação do antígeno, as *Framework Regions* 1, 2 e 4 (FR₁, FR₂ e FR₄). A FR₃ apresenta moderada diversidade em sua seqüência. As regiões de contato com o antígeno, (*Complementary Determinant Regions*; CDRs) CDR₁, CDR₂ e CDR₃ são grande variabilidade na sua extensão. Uma característica observada nas CDR₃ estudadas é a baixa incidência de cisteína e a alta incidência de glicina, quando comparadas com as seqüências do boi (*Bos taurus*) e do carneiro, demonstrando que no cavalo há uma grande flexibilidade no sítio de ligação antígeno-anticorpo, quando comparado a esses animais (ALMAGRO et al, 2006).

A estrutura quaternária das imunoglobulinas eqüinas é estabilizada por pontes de sulfeto entre as duas cadeias pesadas e entre cada cadeia leve e uma cadeia pesada (figura 3), de forma semelhante às imunoglobulinas de outras espécies (ROCKEY, 1966; WEIR & PORTER, 1966b; WEIR et al, 1966c).

As imunoglobulinas eqüinas também apresentam glicosilação (WEIR, 1966b) como é freqüente nessa classe de proteínas. Os sítios de glicosilação se encontram no C_{H2} e C_{H3}, podendo-se deduzir até três possíveis sítios de N glicosilação nas IgGs, dependendo do isotipo (WAGNER et al, 2004). Há pouca informação disponível sobre a estrutura de carboidratos presentes, mas sabe-se da ocorrência de ácido N-glicolil-neuramínico na extremidade das cadeias de oligossacarídeos (RAJU et al, 2000).

1.2.6 – Purificação do Plasma Hiperimune

A necessidade de purificar o plasma hiperimune foi visualizada ainda no final do século XIX, devido à incidência de inúmeras reações adversas, como febre e alergias (WAGNER, 2006). Desde então, várias estratégias para a purificação do plasma foram desenvolvidas. Dentre as principais técnicas empregadas estão a precipitação seletiva das proteínas do plasma, o uso de proteases e a cromatografia (SLATER et al, 2002).

Os protocolos estabelecidos para a purificação do plasma são baseados em uma das técnicas citadas anteriormente ou na associação delas. Em todos os processos o objetivo consiste em diminuir a concentração das proteínas que não contribuem para o efeito protetor do material, aumentando assim a relação

entre teor de proteína e o efeito neutralizante do produto (RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2005).

1.2.6.1 – Purificação por Precipitação Seletiva

1.2.6.1.1 – Precipitação Salina

A precipitação salina é um método muito usado para a separação de proteínas de misturas complexas. O fundamento desse método é a competição entre a proteína e o sal pelas moléculas de água na solução. Com o aumento da concentração salina a proteína é dessolvada, precipitando. Vários sais são usados nesse processo. Sais muito solúveis em água, como sulfato de amônio e o sulfato de sódio são preferidos nesse procedimento. A precipitação das proteínas ocorre de forma seletiva, dependendo da concentração salina (MAURER et al, 2008), ou seja, na competição entre o sal e a proteína pelas moléculas de água, proteínas mais hidrossolúveis precipitam em concentração salina maior, enquanto proteínas menos hidrossolúveis precipitam em concentração salina menor.

O sal mais usado na precipitação seletiva de imunoglobulinas é o sulfato de amônio (SA). Esse sal foi utilizado nos trabalhos iniciais que estabeleceram protocolos de purificação de plasmas hiperimunes para a produção de soros antiofídicos (POPE, 1939; HARMS, 1948), e por isso em um grande número de fabricantes ele ainda é usado.

As condições específicas de uso do SA, como a temperatura da precipitação e a concentração usada, variam muito entre os diferentes produtores. Para a precipitação seletiva de proteínas do plasma, já foram descritas concentrações de 12g/dL (GUTIERREZ et al, 1994) até 50 g/dL (RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2003), utilizando temperaturas entre a temperatura ambiente até 55°C.

A precipitação salina é um dos métodos fundamentais para a produção de soros antiofídicos. Além do Brasil (SILVA et al, 1989) produtores de outros países como Estados Unidos da América (DART & McNALLY, 2001), França (SCHERRRMANN et al, 1997; LANG et al, 1998), Tailândia (RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2003) e Uruguai (CHERONI, 1994) também operam processos baseados em precipitação salina.

1.2.6.1.2 – Precipitação por Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos, da mesma forma que sais, também podem precipitar proteínas, dependendo de sua concentração em solução. O mecanismo dessa precipitação não é tão conhecido como o da precipitação por sais. O ácido orgânico mais usado para essa finalidade é o ácido tricloroacético, embora sua seletividade seja pequena, ou seja, mesmo em baixa concentração ele precipita a maior parte das proteínas presentes.

Na purificação dos soros, o ácido orgânico mais usado é o ácido caprílico (AC) (ácido n-octanóico). Nesse processo utilizam-se o AC numa concentração na qual as IgGs permanecem solúveis, precipitando somente as demais proteínas plasmáticas (SILVA et al, 1989). A precipitação de imunoglobulinas eqüinas pelo AC foi detalhadamente estudada (GUTIEREZ et al, 1994). Inicialmente o pH do plasma deve ser ajustado a 5,8 com ácido cítrico e depois o AC deve ser adicionado até 5% (v/v). Essas condições maximizam o rendimento do soro em relação à potência biológica, pois reduzem a concentração inicial de albumina à cerca de 9% da proteína total presente, e não provocam problemas operacionais, como dificuldades de filtração para a remoção do precipitado. Na Figura 4 é mostrado um resumo desse processo, que é utilizado na Costa Rica para a produção do soro antiofídico polivalente.

A precipitação por AC é utilizada em outros países além da Costa Rica, como Egito (REDWAN, 2006).

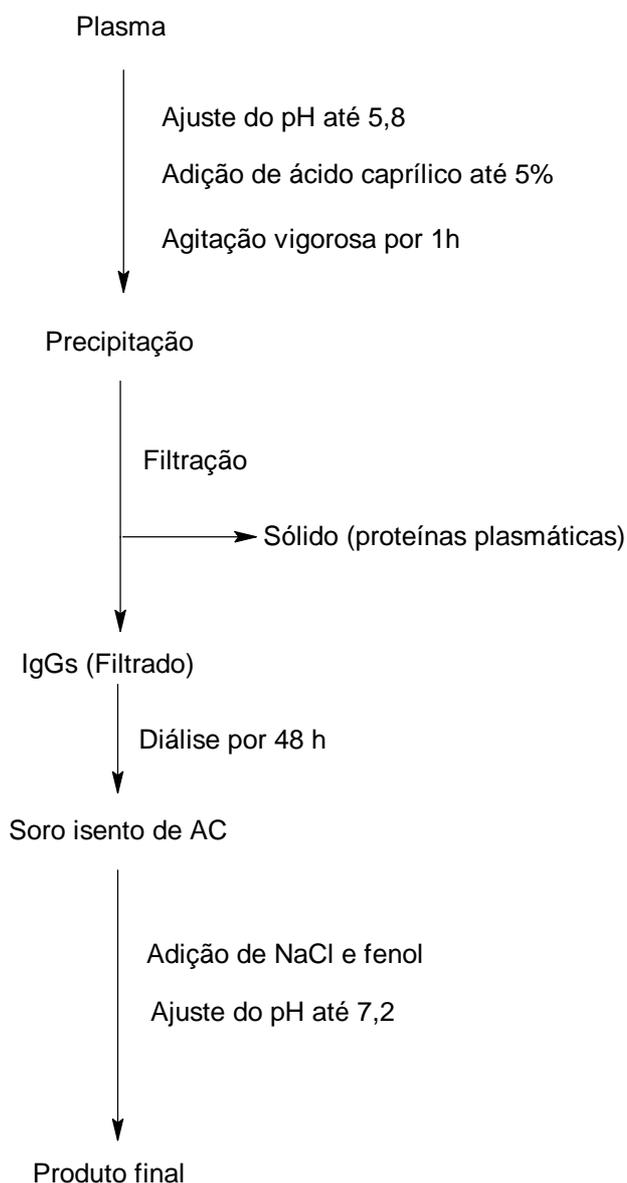


Figura 4: Esquema da produção de soros antiofídicos segundo protocolo adotado no Instituto Clodomiro Picado, San Jose, Costa Rica. (GUTIERREZ et al, 1994; GUTIERREZ et al, 2007)

1.2.6.2 – Purificação Utilizando Hidrólise Enzimática

Sabe-se, há bastante tempo, que proteases podem auxiliar no processo de purificação de soros hiperimunes (POPE, 1939). Essas enzimas hidrolisam as moléculas de anticorpos na região da dobradiça, produzindo dois tipos de fragmentos. O primeiro tipo são os fragmentos cristalizáveis (F_c) que tem dois domínios C_{H2} e C_{H3} . O segundo tipo são os fragmentos capazes de ligar-se ao antígeno. Essa porção contém o N-terminal das cadeias pesadas e as cadeias leves. Esse fragmento pode ser o $F(ab')$ (do inglês *Fragment of antigen*

binding), ou $F(ab')_2$. O $F(ab')$ apresenta um peso molecular de 50 kDa em eletroforese sob condições não redutoras. Nessas mesmas condições o $F(ab')_2$ apresenta peso molecular aproximado de 100 kDa. A formação de cada um desses fragmentos deve-se à diferença de seletividades das proteases utilizadas.

Além de fragmentar as imunoglobulinas, o uso de proteases no processamento de plasma animais apresenta, segundo alguns autores, várias vantagens.

Os fragmentos $F(ab')$ e $F(ab')_2$ são moléculas menores que a IgG, apresentando uma difusão melhor para os tecidos, daí acredita-se que os fragmentos atingem o sítio de inoculação das toxinas com maior facilidade que a IgG. Apesar de essa teoria ser coerente, estudos em modelos animais (GUTIERREZ et al, 1999, GUTIERREZ et al, 2001; GUTIERREZ et al, 2006) e clínicos (LOMONTE et al, 1997) não mostraram diferença de eficácia entre soro antitoxinotrópicos constituídos de IgG e $F(ab')_2$, em relação aos efeitos locais do veneno.

Os fragmentos não têm região F_c , logo eles não desempenham algumas funções típicas das imunoglobulinas, como por exemplo, a ligação a receptores em células de defesa, que resulta na liberação de citocinas e a ativação do complemento (GUTIERREZ et al, 2005). Efeitos adversos aos soros, principalmente anafilaxia, são atribuídos a liberação dessas substâncias.

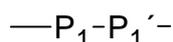
A IgG é mais resistente a hidrólise por proteases que outras proteínas do plasma, como a albumina. Dessa forma o tratamento enzimático gera proteínas menores que podem ser separadas por outras técnicas, como cromatografia ou precipitação seletiva (JONES & LANDON, 2002). E ainda contribui para o aumento da segurança do produto, uma vez que as proteases atuam na inativação de agentes infecciosos possivelmente presentes, como vírus (LAZAR et al, 2002).

Uma desvantagem do tratamento com proteases é a introdução de mais uma proteína heteróloga, aumentando o risco de efeitos adversos ao produto, caso a enzima não seja removida no processo de purificação. Outra desvantagem é que ocorre perda de atividade dos soros, principalmente se o tratamento for por tempo muito prolongado (MORAES & MASSALDI, 2005).

Várias proteases foram estudadas na produção de soros. Algumas, como a tripsina, hidrolisam rapidamente as cadeias das imunoglobulinas em

F(ab) e F(ab')₂, porém a hidrólise prossegue levando a formação de peptídeos sem atividade (JONES & LANDON, 2002). Por essa razão as proteases mais utilizadas são a pepsina e a papaína.

A pepsina suína foi a primeira protease a ser utilizada na produção de soros. Trata-se de uma aspártico protease isolada da mucosa gástrica de uma variedade de animais. A especificidade da enzima suína para clivagem de ligações peptídicas é mostrada abaixo (BANKUS & BOND, 2001):



Onde:

P₁ : não é específico, mas hidrofóbicos, especialmente F e L são preferidos

P'₁ : Não pode ser V, A ou G

No processamento de soros a hidrólise pela pepsina ocorre preferencialmente na região da dobradiça das moléculas, convertendo a IgG íntegra em fragmento F(ab')₂ e F_c (Figura 4). Alguns fatores podem afetar a cinética dessa hidrólise, como o pH e a concentração de enzima.

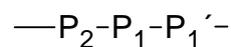
O controle do processo é fundamental, pois a pepsina pode hidrolisar completamente a imunoglobulina, produzindo fragmentos inativos (HARBER & STONE, 1967).

A reação de hidrólise é mais rápida em pH de 2-4, sendo praticamente inativa em pH > 6. Um exemplo da influência do pH é a hidrólise do soro de carneiro por pepsina (JONES & LANDON, 2002). Com a razão enzima/substrato 1:50, em pH 4,5, mesmo após 72h ainda há uma porção razoável de IgG íntegra. No mesmo período de tempo, em pH 4, a hidrólise é completa. Em pH 3,5 após duas horas toda a IgG foi convertida a F(ab')₂, sendo que após 24h a albumina do carneiro também foi completamente hidrolisada. No mesmo tempo em pH 3 à reação ocorre com a mesma velocidade, porém o título do soro decresce muito, demonstrando que a pepsina produz produtos de hidrólise que são inativos.

A hidrólise de IgG eqüina por pepsina foi estudada variando-se o pH e a razão enzima/substrato (MORAIS & MASSALDI, 2005). Na faixa de pH de 2,8-3,0 a IgG presente no plasma é completamente hidrolisada pela pepsina(0,5

g/L), após uma hora. Em pH 3,2 a hidrólise só se completa em uma hora na concentração de 5,0 g/L. A maior parte da IgG purificada por precipitação com AC é hidrolisada após 1h em pH 3,0, na concentração de pepsina de 1g/L. A hidrólise completa da IgG só ocorre após 4h. Foi observado que a nesse mesmo trabalho que a IgG(T) hidrolisa mais rápido que a IgG(a).

A outra protease utilizada na fabricação de soros é a papaína, uma cisteína endopeptidase vegetal, isolada do látex do mamão (*Carica papaya*). A especificidade da papaína para clivagem de ligações peptídicas é mostrada abaixo (BANKUS & BOND, 2001):



Onde:

P₁ : não é específico, mas K e R são preferidos;

P₁' : Não pode ser V;

P₂ : Hidrofóbicos volumoso são preferidos.

A hidrólise é mais rápida em pH de 6-7. A papaína pode ser inibida por vários inibidores de cisteína proteases, como metais pesados.

No processamento de soros, a papaína converte a IgG íntegra em fragmento F(ab') e F_c. Segundo o descrito na literatura, a hidrólise ocorre em uma ligação peptídica anterior ao ponto de hidrólise por pepsina, mantendo uma ponte de sulfeto a mais no fragmento F_c (Figura 5). A papaína não é utilizada na produção de soros no Brasil, ao contrário do que ocorre nos EUA (DART & MACNALLY, 2001).

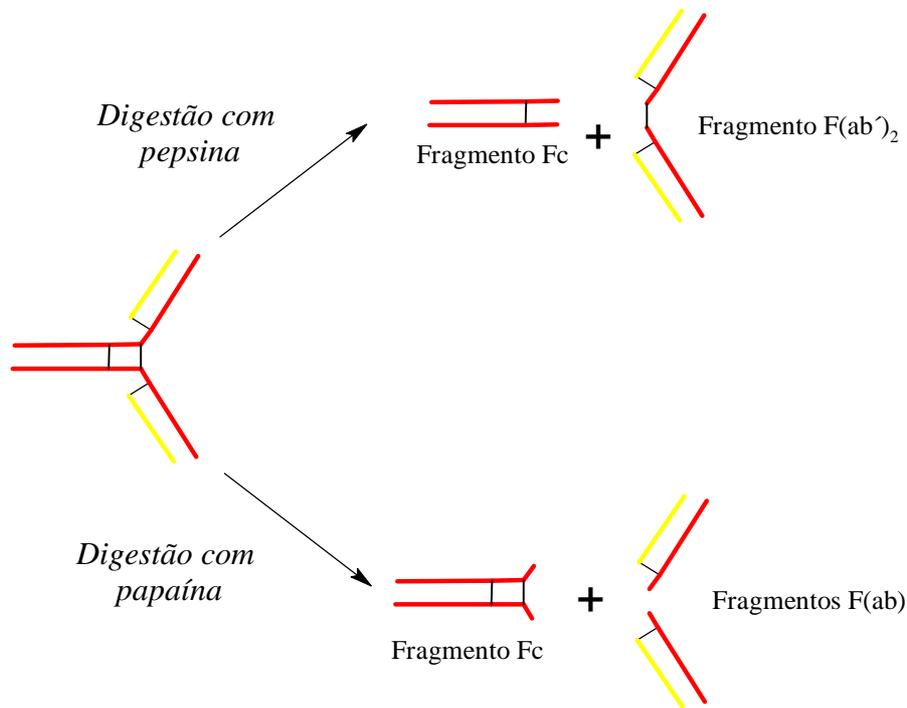


Figura 5: Hidrólise de imunoglobulinas por proteases. A pepsina hidrolisa liberando o fragmento $F(ab')_2$ e o fragmento F_c . No caso da papaína o corte ocorre em um ponto anterior a ponte dissulfeto, gerando dois fragmentos $F(ab)$ e F_c . A cadeia pesada é representada em vermelho, a cadeia leve é representada em amarelo e as principais pontes dissulfeto são representadas em preto.

O processo de purificação dos soros antiofídicos produzidos no Brasil associa a precipitação com SA e a hidrólise das imunoglobulinas eqüinas por pepsina em pH 3,1, para a produção de fragmentos $F(ab')_2$, conforme descrito na Figura 6 (SILVA et al, 1989).

Em 2004, a empresa Zyomix (Califórnia – EUA) patenteou um novo processo para a obtenção de fragmentos $F(ab')_2$. Inicialmente a IgG é submetida a hidrólise por peptídeo N-glicanase (PNGase), enzima que remove os oligossacarídeos N-ligados, presentes no domínio C_{H2} da IgG. A remoção desses carboidratos acelera a hidrólise da IgG pela pepsina. Após a deglicosilação, a IgG murina é completamente hidrolisada por pepsina (1g/L) em pH 4,5 por duas horas. Embora o tempo de reação seja um pouco maior, o pH empregado é maior, o que tende a reduzir a desnaturação de proteínas. Embora os exemplos detalhados nessa patente sejam de anticorpos monoclonais murinos e humanizados, os autores reivindicaram também a aplicação do método também para o processamento de soros antiofídicos, fabricados a partir de IgG de cavalo e carneiro (NOCK et al, 2004).

Da mesma forma que a digestão por pepsina, a hidrólise por papaína também é facilitada pela deglicosilação. Este efeito foi observado em anticorpos murinos e quimérico (homem rato) (RAJU & SCALLON, 2007).

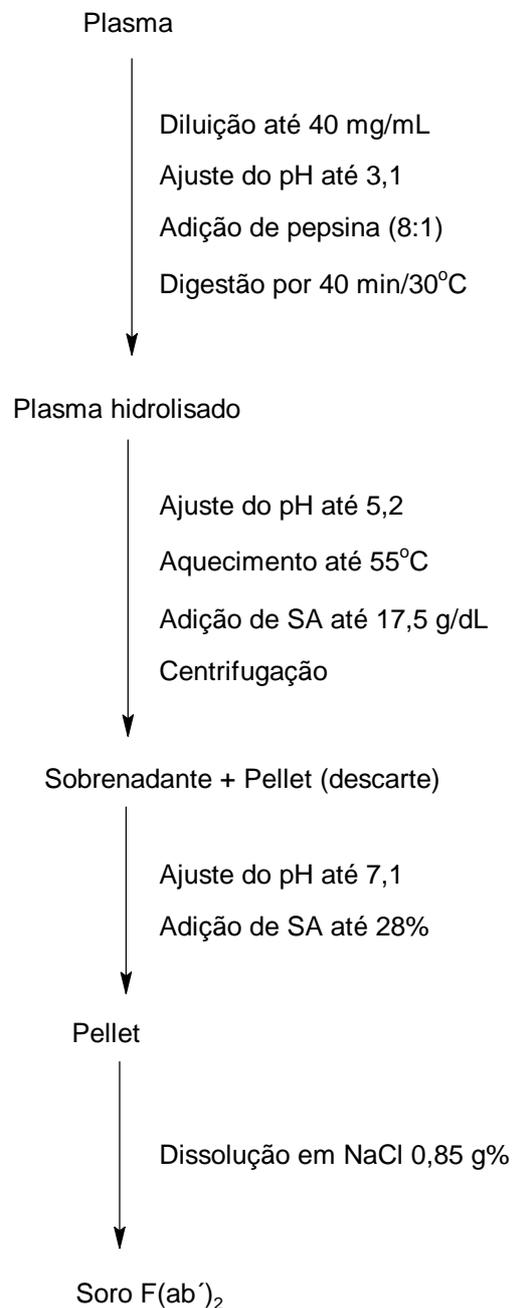


Figura 6: Resumo do processo de purificação do plasma hiperimune para a produção dos soros antiofídicos no Brasil (SILVA et al, 1989)

1.2.6.3 – Purificação por Cromatografia

Na moderna indústria biotecnológica a cromatografia preparativa é um processo bastante disseminado. As colunas empregadas em escala industrial operam praticamente nos mesmos modos usados em escala analítica. Troca iônica, afinidade e gel filtração são os modos mais utilizados (WALSH, 2003).

A grande vantagem do uso de cromatografia industrial é o nível de pureza dos produtos que se consegue atingir, mesmo partindo de misturas complexas de proteínas. É importante destacar que a purificação por cromatografia se dá em condições mais brandas do que as de outros processos, como por exemplo, o de precipitação. Dessa forma, os produtos obtidos por cromatografia têm uma maior potência biológica e uma menor concentração de agregados (JONES & LANDON, 2002).

Por esses motivos, vários protocolos para o processamento de plasmas hiperimune utilizando cromatografia foram desenvolvidos tanto em pesquisa como em escala de produção. Esses procedimentos usam a cromatografia uma técnica complementar às demais citadas anteriormente. A cromatografia é usada para diminuir a concentração de contaminantes como proteínas plasmáticas (GUTIERREZ et al, 2007) e subprodutos da hidrólise das imunoglobulinas (SCHERRMAN et al, 1997), além de remover os resíduos de protease utilizada no processamento do soro (JONES & LANDON, 2002).

1.2.6.3.1 – Purificação por Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica de proteínas se baseia na interação entre as cargas elétricas da fase estacionária e das proteínas, num determinado valor de pH. As colunas de troca iônica podem ser classificadas em aniônicas, que tem em sua superfície grupos negativos, e catiônicas, com grupos positivos em sua superfície. A interação entre a fase estacionária e a proteína é dissociada com o aumento da concentração salina da fase móvel. A concentração na qual ocorre a dissociação depende da distribuição de carga superficial de cada proteína, levando a separação de misturas complexas (XINDU & WANG, 2008).

A purificação de IgGs a partir de plasma eqüino hiperimune, utilizando a cromatografia de troca iônica, foi patenteado pela American Home Products

(Wyeth Lederle) (HUM & LEE, 1989). Nessa patente os autores relatam que a purificação da IgG(T) eqüina por troca iônica é um método mais viável que o uso outras técnicas, como a cromatografia de afinidade.

Há relatos do uso da cromatografia de troca iônica, com sucesso, na purificação de fragmentos F(ab')₂ obtidos da precipitação com SA e digestão com pepsina de imunoglobulinas eqüinas (DIAS et al, 1989). Esse método utilizou o trocador catiônico SP-Sepharose, eluindo o F(ab')₂ com gradiente de 0-0,15 M de cloreto de sódio. Em pH 6,0 se consegue um aumento da atividade específica (relação entre o teor de proteínas e o efeito neutralizador; U/g) do SAC, de 15 para 25. Em pH 5,5, o aumento de atividade específica do SAB foi de 11 para 30.

Essa técnica também foi empregada na purificação do soro contra a víbora européia produzido na França (PEPIN-COVATTA et al, 1997) e soros preparados na Tunísia contra o veneno de escorpiões (KRIFI et al, 1999). Nos dois casos o plasma eqüino é inicialmente purificado por troca iônica, concentrando o isotipo IgG(T). Após a digestão com pepsina, o F(ab')₂ formado é purificado por troca iônica.

Fragmentos F(ab')₂ eqüinos preparados a partir da hidrólise de IgG precipitada com AC também podem ser purificados com sucesso por troca iônica (RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2003).

Outro exemplo de purificação usando cromatografia de troca iônica é o preparo de F(ab')₂ ovinos contra o veneno da abelha européia (*Apis mellifera mellifera*). O produto da hidrólise do plasma hiperimune com pepsina foi passado diretamente em coluna de troca aniônica, em pH 6,0. Nessas condições a pepsina e uma fração mínima de F(ab')₂ ligam-se a resina, sendo que a maior parte do F(ab')₂ não liga a fase estacionária. A fração não ligada a coluna tem uma pureza de 96% de F(ab')₂ (JONES & LANDON, 2002).

1.2.6.3.2 – Purificação por Cromatografia de Afinidade

Outra técnica de cromatografia que foi bastante utilizada na purificação de plasmas hiperimunes é a cromatografia de afinidade. Nesse tipo de cromatografia um ligante com afinidade pela proteína que se pretende purificar é imobilizado na fase estacionária. Esse ligante forma uma interação específica com a proteína de interesse, sem interagir com as demais proteínas presentes.

As proteínas que não interagem com o ligante eluem na primeira parte da corrida cromatográfica. A interação proteína-ligante é então dissociada, utilizando-se na maioria das vezes gradientes salinos ou de pH (XINDU & WANG, 2008).

A escolha primordial na cromatografia de afinidade é o ligante que se pretende imobilizar na fase estacionária. Existem várias colunas de afinidade comerciais, com vários tipos de ligantes. Também são vendidas resinas onde se pode ligar covalentemente um ligante de maior afinidade pela proteína de interesse. Devido principalmente ao preço do ligante, esse tipo de cromatografia tende a ser mais caro que a cromatografia de troca iônica.

Para a purificação de soros, vários ligantes foram estudados. A técnica clássica de cromatografia de afinidade para a purificação de anticorpos é o uso de colunas com proteínas de bactérias que tem alta afinidade por IgG, como a proteína A de *Staphylococcus* e a proteína G de *Streptococcus*, imobilizadas na coluna. Embora essas colunas tenham bastante afinidade pelas imunoglobulinas de várias espécies de mamíferos, o isotipo eqüino IgGa tem maior afinidade por proteína A e o isotipo eqüino IgGb tem afinidade por proteína G (SUGIURA et al, 2000). Nos soros produzidos no Brasil predomina o isotipo IgG(T), que não tem afinidade por essas proteínas nas condições usuais.

A afinidade de IgGs eqüinas por proteína A pode ser aumentada, utilizando-se condições específicas. Em pH 8,0 (tampão borato) e temperatura 4°C, todos os isotipos de IgG ligam-se a proteína A. Esse processo pode ser utilizado para separar as IgGs das demais proteínas do plasma (MOTA et al, 1991).

Outro ligante utilizado em cromatografia de afinidade de soros é o veneno (LANDON et al, 1992; RUSSELL et al, 1984). Nesse caso o veneno é ligado a fase estacionária e o plasma hiperimune é cromatografado na coluna. Na fração não ligada eluem a albumina e as demais proteínas plasmáticas, inclusive imunoglobulinas com baixa afinidade pelo veneno. Na fração ligada se encontram os anticorpos com alta afinidade pelo veneno. Essa estratégia é usada na produção do soro anticrotálico utilizado nos Estados Unidos (DART et al, 1997). Os inconvenientes dessa técnica são a necessidade de uma grande quantidade de veneno para a imobilização na coluna e a baixa durabilidade

desse tipo de matriz, que permite um número limitado de operações (RATABANANGKOON et al, 1997).

Outro ligante que já foi estudado na purificação de soros é o corante Cibacron Blue A3F. Esse ligante tem uma afinidade grande por albuminas e não têm a capacidade de ligar imunoglobulinas (TRAVIS et al, 1976). Na purificação de plasmas eqüino hiperimunes, uma resina com esse corante foi usada para remover a albumina sem a necessidade de precipitação ou hidrólise enzimática. As IgG permaneceram na fração não ligada, com uma pureza maior (DIAS et al, 1989).

O maior inconveniente do uso de protocolos de purificação de soros que envolvem a técnica cromatografia é o custo final do processo, que é bastante superior àqueles protocolos que não utilizam essa técnica (MASSALDI & MORAES, 2006). Na maioria dos países em desenvolvimento esse custo chega a ser proibitivo. Deve-se lembrar que na África subsaariana há uma crise de desabastecimento de soro antiofídico permanente, e os mesmos produtos com custo reduzido, podem ser muito caros para esses países (THEAKSTON & WARRELL, 2000).

1.2.7 – Formulação dos Soros Antiofídicos

A formulação de soros antiofídicos é relativamente simples. A primeira etapa necessária é a diluição do soro hiperimune. Os concentrados obtidos no final da etapa de purificação têm um efeito neutralizador sobre o veneno muito superior ao necessário para o uso clínico, tornando essencial a diluição até a potência correta. São acrescentados então o cloreto de sódio, até a concentração de 0,85g/dL, para isotonzar a formulação. Também é adicionado o conservante. No Brasil é utilizado o fenol, na concentração máxima de 3,5g/L. Apesar de ser um conservante muito tradicional, observou-se que o fenol pode desnaturar as proteínas do soros, levando a turbidez, se o produto não for guardado nas condições corretas (SANTORO et al, 1999).

No final da formulação se obtém o soro antiofídico acabado a granel que deverá ser então envasado em ampolas sob condições assépticas. Antes do envase o produto é submetido à filtração esterilizante, para garantir que não ocorra contaminação por microorganismos. Pode-se acrescentar uma etapa de

filtração para a remoção de pirogênio (endotoxina), para minimizar a ocorrência dessa contaminação (BUENO et al, 2004).

Em alguns países, como Costa Rica (GUTIERREZ et al, 1993) e os EUA (DART et al, 1997), o soro é liofilizado após o envase. Para isso é necessário adicionar outros componentes na formulação, como manitol, que funciona como um estabilizante para a liofilização.

Os soros liofilizados têm uma estabilidade maior que os soros na forma líquida. Esse aumento de estabilidade acarreta duas vantagens. A primeira é o aumento do prazo de validade dos produtos. No caso da Costa Rica, que utiliza o soro nas duas apresentações, a forma liofilizada tem validade de 60 meses, enquanto a forma líquida tem validade de 36 meses (GUTIERREZ et al, 1993).

A segunda vantagem é que o aumento de estabilidade permite um tempo maior de estocagem fora de cadeia de frio. Essa propriedade é importante porque é muito comum que o acidente ofídico ocorra em áreas remotas, com dificuldade de fornecimento de eletricidade, como florestas tropicais.

No Brasil, formulações piloto de soros liofilizados foram preparadas, mais essa apresentação do soro não é usualmente fabricada (GARCIA, 2005). Existem reivindicações nesse sentido, inclusive um projeto de lei no senado federal, de autoria do Senador Tião Vianna (Acre). A alegação do senador é que o produto liofilizado seria mais interessante para a população da bacia amazônica, devido a maior estabilidade.

A grande desvantagem da liofilização do soro antiofídico é o custo desse processo, que é elevado. Por outro lado, o aumento da estabilidade desse tipo de apresentação poderia melhorar a gestão de estoques, reduzindo o custo final do programa (QUEIROZ, 2005).

Outra desvantagem é o tempo necessário para a reconstituição do soro. O soro antiofídico liofilizado a base de F(ab') leva 25 min para a dissolução completa. O soro liofilizado constituído de IgG leva até 45 min para a completa dissolução. Esse tempo pode ser um complicador importante nos atendimentos de emergência (DART et al, 2001).

1.2.8 – Controle de Qualidade de Soros Antiofídicos

1.2.8.1 – Normatização da Qualidade de Soros Antiofídicos

Os medicamentos biológicos, devido à sua variabilidade intrínseca, requerem na maioria das vezes controles diferentes dos aplicados aos medicamentos sintéticos, tais quais os ensaios de potência onde mede-se o efeito farmacológico do produto, para aferir sua qualidade. Além disso, por se originarem de fluidos biológicos, cultivos de microorganismos, cultivos celulares e tecidos vivos, os produtos biológicos tem um risco de contaminação por patógenos muito maior que os medicamentos sintéticos (BURNOUF et al, 2004). Por essas razões, a normatização para o controle de qualidade de biológicos deve ser muito rígida. No caso dos soros antiofídicos ainda há alguns agravantes, de natureza sócio-econômica.

A maior parte dos acidentes ofídicos ocorre em áreas tropicais e subtropicais do planeta, principalmente em países com os sistemas de saúde precários (SANTOS, 2005). Nesses países a produção dos soros é feita geralmente por laboratórios estatais, freqüentemente com deficiências orçamentárias e técnicas (MASSALDI & MORAES, 2006)

Várias dessas nações não têm um sistema de vigilância sanitária operante em todos os níveis (registro, inspeção e análises independentes), com autonomia técnica e administrativa em relação à produção do soro. Essas carências acarretam a falta de um controle externo que aponte os possíveis desvios de qualidade dos produtos (WHO, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), ciente desses problemas, gerou em 1973 um informe técnico com as recomendações para a produção e controle de qualidade de soros antiofídicos. Infelizmente esse informe técnico não foi atualizado, e atualmente se encontra muito defasado em relação aos avanços da indústria de biotecnologia.

A iniciativa mais recente da OMS foi à realização de eventos para discussão de problemas ligados ao acesso, produção e distribuição de soros em escala mundial (THEAKSTON et al, 2003; WHO, 2007) e regional na América Latina (GUTIERREZ et al, 2007). Nessas ocasiões o tema qualidade foi sempre discutido, principalmente como os processos de produção influenciam no efeito neutralizador sobre o veneno e na segurança do produto.

Compêndios oficiais (Farmacopéias) e órgãos reguladores de alguns países também se preocuparam em estabelecer normatização para a produção e o controle de qualidade dos soros antiofídicos.

Na União Européia, o EMEA (*European Medicines Agency*) publicou em 2002 uma norma para a produção e controle de qualidade de imunoglobulinas e derivados de origem animal, para uso terapêutico em seres humanos (EMEA, 2002). Os pontos críticos que essa norma determina são:

- Controle de sanidade dos animais utilizados. No caso do uso de cavalos, vários testes devem ser aplicados, inclusive para a detecção de 16 tipos de vírus;
- Outros produtos de origem animal utilizados (p.e. pepsina), devem se originar de animais também controlados para infecções virais e de regiões livres de encefalite espongiforme dos bovinos;
- A purificação dos produtos deve seguir um protocolo validado, com métodos para controle em processo. Devem ser estabelecidos limites justificados para os ensaios realizados;
- Deve ser evitada a formação de agregados moleculares e técnicas adequadas devem ser empregadas para a avaliação do produto final;
- O processo de inativação viral é importante e deve ser validado. Esse processo não deve interferir na potência do soro antiofídico;

No Brasil, a legislação que trata a respeito é a Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996, que define questões ligadas desde a produção ao estabelecimento de parâmetros que medem a qualidade dos soros antiofídicos, detalhando os ensaios a serem realizados e um protocolo de produção mínimo para cada lote de produto fabricado. É interessante destacar algumas diferenças entre a Portaria citada e a norma do EMEA.

- A Portaria estabelece que os animais utilizados devem apresentar boa saúde, mas não sugere nenhum acompanhamento específico a ser realizado, como, por exemplo, a pesquisa de vírus;
- A Portaria não define a necessidade de controles em processo;
- A Portaria não estabelece nenhum critério sobre cuidados no acompanhamento na formação de agregados moleculares;

- Diferente do EMEA, a Portaria estabelece limites e procedimentos para a realização dos ensaios no produto final;

Outra regulamentação importante para os soros antiofídicos no Brasil é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº 315, de 26 de outubro de 2005 (BRASIL, 2005). Essa RDC regulamenta o registro de produtos biológicos, incluindo soros antiofídicos. Os soros antiofídicos são denominados de soros hiperimunes, e são definidos como "... imunoglobulinas específicas, de origem heteróloga, purificadas... capazes de neutralizar seus antígenos específicos". Essa definição não inclui os fragmentos de imunoglobulinas, que são os produtos efetivamente usados no Brasil.

1.2.8.2 – Ensaios Aplicados no Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos

Alguns compêndios oficiais regulamentam os parâmetros mínimos de qualidade que os soros antiofídicos deverão seguir. Esses compêndios recomendam ensaios, com suas metodologias específicas e limites que deverão ser adotados. É interessante destacar que compêndios oficiais importantes, como a Farmacopéia dos Estados Unidos (USP XXXI), não têm uma monografia específica para soros antiofídicos.

Os ensaios recomendados por esses compêndios para a avaliação da qualidade dos soros podem ser divididos em dois grupos, são eles: Ensaios gerais e específicos.

Os primeiros tipos de ensaios são aplicados para as formas farmacêuticas líquidas, para uso injetável, nas quais se incluem os soros. Os ensaios que se incluem nessa modalidade compreendem as medidas de pH, volume médio, teor de conservantes (fenol), teor de isotonzante (cloreto de sódio), esterilidade e pirogênio. As únicas diferenças observadas nesses ensaios para os soros antiofídicos em relação aos demais produtos farmacêuticos estão justamente nas especificações para os limites de pirogênio, pH, teor de conservantes e isotonzantes.

O segundo grupo engloba ensaios específicos para os soros antiofídicos. O principal é o de potência, que avalia a capacidade do soro de proteger animais frente a um veneno de referência (SELLS, 2003).

Diferentes ensaios para a avaliação da pureza também são recomendados, dependendo da norma. A seguir serão discutidas as principais normas internacionais e nacionais para o controle de qualidade de soros antiofídicos.

1.2.8.2.1 – Farmacopéia Européia V edição (F.E. V ed)

A quinta edição da Farmacopéia Européia tem uma monografia geral para soros antiofídicos, que lista vários ensaios (Tabela 6).

É recomendado um teste de potência biológica que é baseado na proteção que o soro deverá produzir em animais ao efeito do veneno. Essa proteção é avaliada de acordo com a dose letal do veneno (DL_{50}), conforme mostrado na Tabela 06.

O teor máximo de proteínas presentes no soro, segundo a monografia é de 10 g/dL, determinado pelo método de Kjeldahl.

Também é recomendado teste físico-químico específico, para a avaliação da pureza dos soros, que é a eletroforese do tipo SDS-PAGE em condições não redutoras, com o gel na concentração de 10%. A F.E. determina que os soros antiofídicos podem ser constituídos de imunoglobulinas puras ou fragmentos $F(ab')_2$, dependendo do processo adotado pelo fabricante. Se forem constituídos desses fragmentos não devem conter outro tipo de fragmento, como o F_c , nem imunoglobulinas íntegras, que serão determinados nesse ensaio. O teor máximo especificado de albumina é de 3% da proteína total da amostra (Tabela 6).

A F.E. recomenda também um ensaio para avaliar a formação de agregados. Esses agregados deverão ser verificados por cromatografia líquida de exclusão molecular de alta resolução.

1.2.8.2.2 – Farmacopéia Brasileira IV Edição (F.B. IV ed.)

A F.B. IV Ed recomenda um ensaio de potência, baseado na capacidade de neutralização do soro sobre o efeito do veneno em ratos. A expressão dessa capacidade deverá ser feita em relação a massa de veneno, não em relação a dose letal (DL_{50}) do veneno, como na F.E. Para minimizar o efeito da

variabilidade dos venenos sobre o ensaio, a padronização deverá ser feita sobre um veneno de referência nacional.

Na edição atual são recomendados os ensaios listados na Tabela 6. O mais importante para a avaliação de pureza é o teor de proteína total. Essa determinação é feita pelo método de Kjeldahl, que avalia o nitrogênio total da amostra. Por esse motivo, o método de Kjeldahl fornece apenas a concentração total de proteínas na amostra, sem informar as características de homogeneidade do produto. O limite adotado pela F.B, de 15 g/dL, é 50% maior que o recomendado pela F.E.

Não há recomendação de um ensaio para avaliar quanto da proteína presente no soro corresponde ao fragmento $F(ab')_2$, que é responsável pela proteção contra o efeito tóxico do veneno. Também não é recomendada a avaliação da formação de agregados.

O ensaio que complementa a avaliação de proteínas é o teor de sólidos totais. Esse ensaio é uma avaliação gravimétrica do teor de todo o material dissolvido, e deverá ser a soma aproximada dos teores de proteínas, cloreto de sódio e fenol.

Tabela 6: Ensaios e especificações para soros antiofídicos da F.E. V ed. e da F.B.IV ed.

| Ensaio | F.B. IV ed. | F.E. V ed. |
|------------------------|---|--|
| Esterilidade | Ausência de crescimento | Ausência de crescimento |
| Pirrogênio | 1 mL/kg de peso de coelho | 1 mL/kg de peso de coelho |
| Teor de fenol | < 0,35 g/dL | < 0,25 g/dL ⁽¹⁾ |
| Teor de NaCl | 0,85 g/L | 0,85 g/L |
| Teor de sólidos totais | < 20 g/dL | Não há |
| Teor de Proteínas | < 15 g/dL | < 10 g/dL |
| Potência | 1mL de soro neutraliza 5 mg de veneno. ⁽²⁾ | 1mL de soro neutraliza 100 DL ₅₀ de veneno ⁽³⁾ |
| Pureza | Não há | Eletroforese não redutora. Não mais de 3% de albumina |
| Agregados | Não há | Deverá conter apenas IgG ou $F(ab')_2$. Cromatografia de exclusão molecular de alta resolução. |

1-meta cresol 2-para veneno de ofídios encontrados no Brasil. 3-para venenos de *Vípera* de origem européia.

1.3 – Soros Antiofídicos no Brasil

1.3.1 – Fabricação e Distribuição dos Soros Antiofídicos no Brasil

A produção e a distribuição de soros antiofídicos para uso humano no Brasil são coordenadas pelo governo federal. Esses dois aspectos do mercado dos soros antiofídicos passaram para a esfera federal na década de oitenta, depois de uma situação de desabastecimento que ficou conhecida como “crise do soro”.

Essa crise foi desencadeada por ações do Ministério da Saúde, no início da década de 1980. Pode parecer estranha essa afirmativa, mas esses fatos devem ser avaliados do ponto de vista histórico.

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi implementado pelo Ministério da Saúde (MS) em 1973, com o objetivo específico de controlar as seguintes doenças imuno preveníveis: Poliomielite, sarampo, febre amarela, coqueluche e tétano. Desde de seu início o PNI previa a montagem de um laboratório nacional para a avaliação da qualidade das vacinas utilizadas nas campanhas de imunização. Em 1980 essa necessidade se tornou mais clara, com a descoberta de contaminação de vacinas importadas da Iugoslávia por fungos (PONTE, 2003). Esse fato acarretou atrasos nos programas de vacinação e mobilizou a opinião pública.

Nesse mesmo período estava se consolidando a transferência do antigo Laboratório Central de Controle de Drogas Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) para a Fundação Oswaldo Cruz. O novo laboratório passou a ser chamado de Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), e devido ao ocorrido com a vacina de pólio, foi decidido que o INCQS analisaria as vacinas utilizadas pelo PNI (GEMAL & LEAL, 2005).

Em 1983 o INCQS reprovou lotes de vacina tríplice bacteriana produzida pela empresa multinacional Synthex, em São Paulo, o que resultou na inspeção da empresa pela vigilância sanitária. A inspeção constatou que a planta de produção tinha várias deficiências. Foram feitas exigências, a serem cumpridas pela empresa, para o retorno a produção. Diante de tal situação a empresa decidiu encerrar suas atividades no Brasil (PONTE, 2003).

Nessa ocasião a Synthex do Brasil era o principal fornecedor nacional de vacina tríplice bacteriana e de soros antiofídicos. O encerramento das

atividades dessa companhia acarretou o desabastecimento de soros antiofídicos em 1985. Ocorreram vários óbitos e seqüelas nas vítimas de mordidas, que não tinham o produto disponível para seu tratamento.

A primeira reação do governo foi tentar importar o produto, medida que havia sido tomada com sucesso no caso da vacina tríplice bacteriana. Mas, no caso dos soros, devido a suas particularidades, não havia disponibilidade no mercado internacional dos produtos, o que agravou o desabastecimento. Outro problema é a especificidade da composição dos venenos das serpentes, levando a pouca eficácia de soros importados sobre serpentes encontradas no país.

Na ocasião três laboratórios nacionais produziam soros antiofídicos, o Instituto Butantan (IB), a Fundação Ezequial Dias (Funed) e o Instituto Vital Brasil (IVB). Esses laboratórios encontravam-se com poucos recursos e com deficiências técnicas muito claras. Uma medida emergencial foi à liberação de recursos para a recuperação das linhas de produção do IB e da Funed (BERMUDEZ, 1992) e lentamente o abastecimento voltou ao normal.

Um desdobramento positivo da crise dos soros foi à percepção por parte das autoridades da importância estratégica do setor de imunobiológicos para a saúde pública brasileira. Essa mudança levou a criação do Programa de Auto-suficiência Nacional em Imunobiológicos (PASNI), em 1985. Esse programa previa que até 1990 a produção nacional de vacinas e soros atenderia o mercado interno. Apesar de todas as metas não terem sido alcançadas na produção de vacinas, os investimentos feitos pelo governo nos laboratórios produtores resolveram o problema da produção soros (PONTE, 2003).

A estrutura da produção e distribuição dos soros antiofídicos atual do Brasil resultou do modelo adotado nessa ocasião.

Na cadeia de produção de soro antiofídico alguns laboratórios apenas atuam na primeira etapa da produção, que é o preparo do plasma equino hiperimune, enquanto os outros realizam todas as etapas, chegando ao produto final. Atualmente no país seis laboratórios fazem o preparo de concentrados de imunoglobulinas eqüinas, sendo eles o Instituto Butantan (IB), o IVB, a Funed, o Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), o Instituto de Biologia do Exército (IBEX) e a Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). Os dois últimos não formulam os soros, sendo que os

concentrados por eles preparados são processados pelo IB (RAW et al, 2005). Na Tabela 7 são sumarizadas algumas informações sobre esses fabricantes.

Tabela 7: Produtores de soros antiofídicos para uso humano no Brasil

| Fabricante | Subordinação | Etapa do processo realizada |
|------------|----------------------|-------------------------------|
| IB | SES SP | Todo |
| IVB | SES RJ | Todo |
| Funed | SES MG | Todo |
| CPPI | SES PR | Todo |
| IBEX | Ministério da Defesa | Preparo do plasmas hiperimune |
| IQUEGO | SES GO | Preparo do plasma hiperimune |

A programação de fornecimento de soros é feita mediante a reunião onde o CGPNI determina a demanda para compra no ano seguinte e os fabricantes oferecem sua capacidade de fornecimento. Ao final dessa reunião fica acertada a quantidade de ampolas e o cronograma de entrega para cada fabricante. A medida que os lotes são entregues, a Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI) paga R\$ 45,00 por ampola de soro fornecida, segundo Tabela vigente em 2007¹. A figura 7 mostra a distribuição de tipos de soros adquiridos pelo CGPNI em 2007.

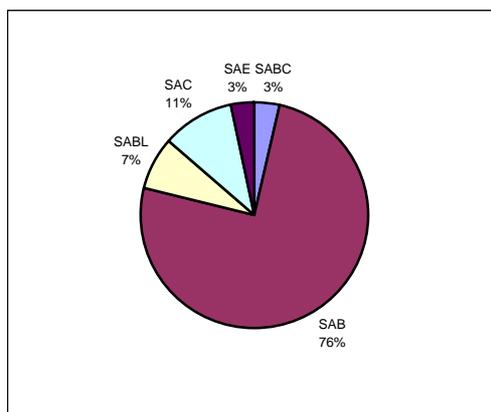


Figura 7: Percentual de aquisição de soros antiofídicos no Brasil no ano de 2006, segundo dados do Ministério da Saúde.

Os laboratórios fabricantes encaminham os soros produzidos à Central Nacional de Distribuição de Imunobiológicos (CENADI), divisão da CGPNI, que

¹ Informações cedidas por Carmem Silvera e Laura Bedin (CGPNI)

é responsável pela cadeia de frio para estocagem e distribuição dos produtos. Por fim, os soros são distribuídos às Secretarias Estaduais e Municipais de saúde, que são responsáveis pela disponibilidade nas unidades de atenção à saúde.

Antes da distribuição, a CENADI encaminha amostras dos lotes de soro fornecidos pelos laboratórios produtores para o INCQS, que analisa essas amostras antes da liberação para a distribuição. Junto com as amostras são encaminhados os protocolos de produção dos lotes, que resume informações sobre a produção do lote e os resultados das análises realizadas no laboratório fabricante.

Somente após a emissão de laudo considerando o produto satisfatório pelo INCQS que o CENADI distribui os soros para as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde. No caso de emissão de laudo considerando o produto insatisfatório, o lote é devolvido ao produtor para descarte. A Figura 8 resume o fluxo do processo

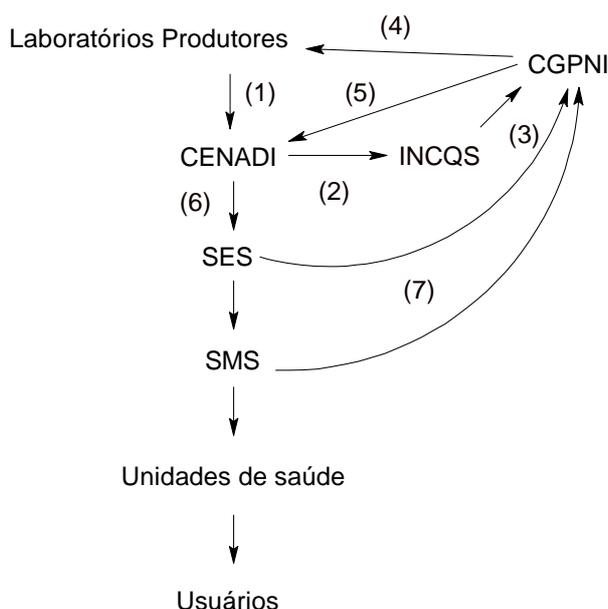


Figura 8: Esquema da distribuição de soros antiofídicos no Brasil. (1) Os laboratórios produtores entregam os soros para a CENADI; (2) A CENADI encaminha amostras para o INCQS; (3) O INCQS encaminha laudos analíticos das amostras a CGPNI; (4) O PNI encaminha aos produtores nacionais os laudos analíticos do INCQS; (5) a CGPNI autoriza o CENADI a iniciar a distribuição nacional; (6) o CENADI encaminha os soros as SES e SMS; (7) as unidades que utilizam os soros devem retornar ao CGPNI as notificações de ocorrências para o acompanhamento epidemiológico e melhorar o sistema.

1.3.2 – Epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil

Vários estudos foram feitos sobre a epidemiologia de acidentes ofídicos no Brasil. Esses estudos foram fundamentais para o estabelecimento da demanda nacional por soros, do perfil de vítimas de acidentes ofídicos e das necessidades locais para a distribuição dos soros (BOCHENER, 2003a).

No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos acontece com trabalhadores rurais do sexo masculino, sendo que o pico da atividade agrícola no centro sul coincide com a maior incidência de casos. As mordidas ocorrem principalmente nos pés e pernas, e em menor número nas mãos e braços. (FAN et al, 2002).

A média anual de ocorrências é de 20 mil casos, com cerca de 100 óbitos. A grande maioria dos casos é por espécies do gênero *Bothrops*, seguidas por *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*. Na Figura 9 é mostrada a distribuição por regiões segundo dados disponíveis na página do Ministério da Saúde, para o ano de 2006. Pode-se observar que na região Sudeste, a mais populosa do país, ocorre menos casos que na região Norte. Essa diferença deve-se a maior urbanização da população do sudeste, e também a modernização das práticas agrícolas (FAN et al, 2002).

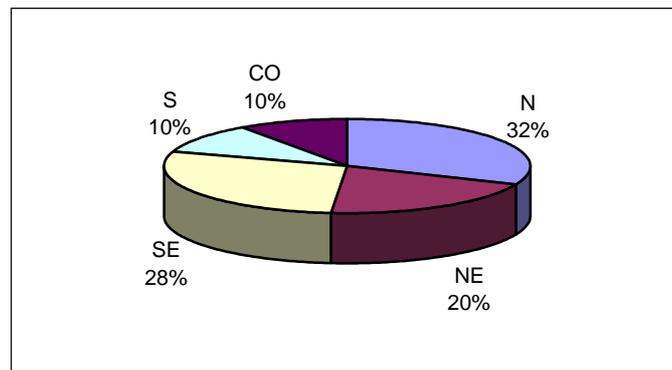


Figura 9: Distribuição dos acidentes ofídicos nas regiões geográficas do Brasil no ano de 2006, segundo dados do Ministério da Saúde. (CO – Centro Oeste; N – Norte; NE – Nordeste; S – sul; SE – Sudeste)

1.3.3 – Uso Clínico dos Soros Antiofídicos

Soros antiofídicos são hoje os únicos tratamentos disponíveis para envenenamento por serpentes. Como o seu uso se iniciou há mais de um século, vários soros antiofídicos não foram submetidos a estudos clínicos dentro do modelo mais modernos (DART & McNALLY, 2001). Apesar disso, estudos clínicos mais recentes comprovaram a eficácia dos soros no tratamento do envenenamento (LOMONTE et al, 1996), principalmente na reversão dos efeitos sistêmicos dos venenos. Esses efeitos são bastante variados.

Vários efeitos tóxicos são observados em modelos animais, devido a grande diversidade de composição dos venenos (SANCHEZ et al, 2002). O tipo e a intensidade desses efeitos variam bastante com a espécie de ofídio responsável pelo envenenamento e com o volume de veneno injetado na mordida (RODRIGUES SIMIONI, 2004).

Os distúrbios de coagulação sanguínea e efeitos locais (necrose e inchaço) ocorrem na maioria dos acidentes ofídicos. No caso do acidente botrópico (JORGE & RIBEIRO, 1997), crotálico (SANO-MARTINS et al, 2001) e laquétrico (MELGAREJO, 1997), por exemplo, a incidência desses distúrbios é elevada.

Os estudos clínicos com soros antiofídicos avaliam a eficácia dos produtos de acordo com a reversão desses sintomas clínicos característicos do envenenamento. No caso de acidentes por *Bothrops*, a eficácia é avaliada pela volta ao tempo de coagulação sanguínea normal. Em estudo clínico com soros antibotrópicos produzidos pelos três principais produtores nacionais, a coagulação normal se restabeleceu após 6h da aplicação da segunda dose do soro (WARRELL et al, 1993).

O protocolo de uso clínico dos soros no Brasil recomenda inicialmente um diagnóstico exato do tipo de envenenamento que o paciente foi vítima, para a administração do soro correto (BRASIL, 2001). Os envenenamentos têm características clínicas distintas, sendo que os causados por *Bothrops* e *Lachesis* são os mais semelhantes. Na Tabela 8 são resumidas as principais características clínicas dos acidentes ofídicos.

Tabela 8: Características clínicas e tratamento dos envenenamentos por serpentes Brasileiras⁽¹⁾.

| Tipo de sintoma | Botrópico | Crotálico | Laquético | Elapidico |
|-----------------|---|--|--|---|
| Leve | Dor local discreta ou ausente Sem alteração sistêmica T.C*. normal ou alterado Tratamento: 2-4 ampolas | Neurointoxicação leve Não há alteração da cor da urina Tratamento: 5 ampolas | Devido ao tamanho do animal nunca é considerado leve ou moderado | Sempre graves devido ao risco de insuficiência respiratória aguda |
| Moderado | Dor local evidente Sem alteração sistêmica T.C. normal ou alterado Tratamento: 4-8 ampolas | Neurointoxicação leve Alteração da cor da urina Tratamento: 10 ampolas | - | - |
| Grave | Dor local intensa Sem alteração presente T.C. normal ou alterado Tratamento: 12 ampolas | Neurointoxicação grave Urina escura Tratamento: 20 ampolas | Intensidade avaliada pela intensidade de hipotensão, bradicardia e diarreia Tratamento: 10-20 ampolas | Tratamento: 10 ampolas |

*TC: tempo de coagulação. (1) Adaptada do Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, Ministério da Saúde, Brasília 2001.

Os acidentes também são classificados de acordo com a intensidade dos sintomas e o animal envolvido, em leves, moderados e graves, conforme mostrado na Tabela 8. Recomenda-se que o paciente seja tratado com o número de ampolas adequado conforme o diagnóstico.

Se o paciente não é encaminhado rapidamente a soro terapia, há risco de morte, em decorrência dos efeitos sistêmicos, como hemorragias e insuficiência renal. Seqüelas graves, principalmente devido aos efeitos no local da mordida (figura 10), como necrose e gangrena (LALLOO & THEAKSTON, 2003), também podem ocorrer.



(a)



(b)

Figura 10: Exemplos dos efeitos do veneno sobre as vítimas de acidentes ofídicos que não receberam tratamento adequado (a) Amputações decorrentes dos efeitos causados por mordidas de *Bothrops atrox*.(WHO, 2007) (b) Efeito local do veneno de *Lachesis* sp. (BRASIL, 2001)

1.3.4 – Efeitos Adversos ao Uso dos Soros Antiofídicos

Desde o final do século XIX, inúmeros efeitos adversos foram descritos ao uso da soroterapia. Atualmente esses efeitos são divididos em precoces e tardios (LALLOO & THEAKSON, 2003), sendo que incidência desses efeitos é muito variável (KRIFT et al, 1999).

1.3.4.1 – Efeitos Precoces

Os efeitos precoces ocorrem logo após o início de administração de soro, começando entre 10 minutos até três horas após a aplicação do produto. As incidências das reações precoces aos soros têm grande variação entre os diferentes produtores e estudos realizados. Tais diferenças devem-se ao nível de acompanhamento clínico dispensado ao paciente nas duas primeiras horas

após a aplicação do soro e a tecnologia de produção e purificação empregada pelo fabricante (WARRELL et al, 1986).

A maior incidência é de reações leves, incluindo urticária, náuseas, diarreias, dor de cabeça, arrepios e febre. Em alguns casos pode haver uma evolução para um quadro clínico mais grave, como edema de glote e hipotensão devido ao choque (MORAN et al, 1998).

Esses efeitos são relacionados por alguns autores à ativação do complemento pelo uso de imunoglobulinas heterologas (GUTIERREZ et al, 2002). Embora a ativação do complemento ocorra em modelos animais, ela não foi observada na maioria dos pacientes que desenvolveram reações precoces (WARRELL et al, 1986).

Outros trabalhos relacionam essas reações à presença de anticorpos antiproteínas de animais na população rural, principais vítimas de acidentes ofídicos. Essa população convive com cavalos, o que, segundo esses autores, explica a produção desses anticorpos (GUTIERREZ et al, 2005).

Nos soros antibotrópicos produzidos no Brasil a incidência de efeitos precoces é alta, conforme mostrado na Tabela 9 (WARRELL et al, 1993). Esse estudo clínico foi realizado a cerca de 15 anos, e os produtores podem ter incorporado mudanças em suas tecnologias de fabricação, que influenciam na incidência de efeitos adversos.

Em outro estudo foi observado que pacientes vítimas de acidente crotálico, tratados com o SAC, tinham um risco anafilaxia 30 vezes maior que os demais pacientes internados em uma mesma unidade de emergência, confirmando a incidência elevada desses efeitos (BOCHENER & STRUCHINER, 2003).

Tabela 9: Efeitos adversos observados em soros antiofídicos produzidos no Brasil (WARRELL et al, 1993)

| Tipo de acidente | Leve (4 ampolas) | | | Grave (8 ampolas) | | |
|--------------------------|------------------|---------|---------|-------------------|---------|---------|
| | IB | IVB | Funed | IB | IVB | Funed |
| Fabricantes | 30 | 28 | 31 | 9 | 13 | 10 |
| Número inicial | 25 (87%) | 8 (37%) | 16(56%) | 9 (100%) | 7 (53%) | 7 (70%) |
| Reações precoces | 21 | 22 | 24 | 7 | 8 | 9 |
| Acompanhados por 30 dias | 0 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| Reações tardias | | | | | | |

Apesar de ser elevada, a incidência de efeitos precoces no Brasil não é a maior descrita na literatura. Na Tabela 10 são mostrados efeitos adversos vários soros produzidos em outros países. No primeiro estudo, realizado na Colômbia, dois produtos de tecnologia similar apresentaram uma incidência de efeitos precoces significativamente diferentes, confirmando que o nível tecnológico do produtor influencia na incidência desses efeitos.

Tabela 10: Incidência de reações precoces a soros antiofídicos em estudos clínicos feitos fora do Brasil. A maioria dos produtos estudados é derivada de plasma de cavalos

| Produtor | Produto | Reação | País | Referência |
|---------------------------|---------------------|--------|---------------|-----------------------|
| IB ⁽¹⁾ | F(ab') ₂ | 36,7 % | Colômbia | DIAS et al, 1998. |
| | IgG | 11,1 % | | |
| INS ⁽¹⁾ | IgG | 81,8 % | Colômbia | GUTIERREZ et al, 1999 |
| | IgG ⁽¹⁾ | 37% | | |
| ICP | IgG ⁽²⁾ | 15% | EUA | DART & McNALLY, 2001 |
| | IgG | 39% | | |
| Wyeth ⁽³⁾ | F(ab') | 0 | | |
| Protherics ⁽⁴⁾ | F(ab') ₂ | 6,3% | Camarões | LANG et al, 1998 |
| Pasteur (Aventis) | F(ab') ₂ | 76% | África do Sul | MORAN et al, 1998 |
| SAIMR | F(ab') ₂ | 65% | Tailândia | WARREL et al, 1986 |
| TRC | N.I. | | | |

⁽¹⁾ preparado pela precipitação com SA ⁽²⁾ preparado por precipitação com AC ⁽³⁾ preparado pela precipitação com SA e cromatografia de troca iônica ⁽⁴⁾ animal soro produtor é o carneiro e a purificação por cromatografia de afinidade

Para evitar os efeitos precoces, o uso profilático de medicamentos é recomendado (BRASIL, 2001; BRASIL, 2008). São administrados em paralelo ao soro antagonistas H₁, antagonistas H₂ e corticóides, reduzindo a incidência de efeitos graves. Apesar dessa recomendação, estudos clínicos indicam que o benefício do uso desses produtos é muito pequeno na maioria dos casos (FAN et al, 1997; WILLIAMS et al, 2007).

1.3.4.2 – Efeitos Tardios

Algum tempo após o tratamento com o soro e a reversão do efeito do envenenamento o paciente pode desenvolver uma síndrome que é conhecida como “mal do soro”. Esse efeito tardio ao uso do soro ocorre cerca de 7 a 14 dias após o início do tratamento, sendo caracterizada por um aumento de temperatura, com uma elevação da proteinúria, e hipersensibilidade cutânea

(figura 11). A explicação para esses efeitos é a formação de anticorpos humanos contra o anticorpo eqüino e contra o complexo anticorpo veneno (KRICKA, 1999).

O estudo clínico com os soros dos três fabricantes nacionais demonstrou uma incidência relativamente baixa desse efeito (Tabela 9). Segundo os autores o uso profilático de antihistamínicos no início do tratamento pode ajudar a explicar essa baixa incidência (WARRELL et al, 1993).

A sub notificação da febre dos soros é considerada elevada, porque após a alta vários pacientes não retornam aos serviços de saúde. Por esse motivo pode-se considerar a incidência real das reações tardias é superior a observada.



Figura 11: Paciente acometido pelo mal do soro, dez dias após o início da soroterapia. Lesões do tipo urticária nas costas (BRASIL, 2001).

2 - Objetivos:

2.1 – Objetivo Geral do Trabalho

O objetivo desse trabalho consiste em avaliar a pureza dos soros antiofídicos nacionais, aplicando metodologias já existentes e com uma outra metodologia desenvolvida especificamente para esse fim.

Essa avaliação justifica-se pela incidência de efeitos adversos ao uso de soros antiofídicos no Brasil. A legislação Brasileira atual, por outro lado, não exige uma avaliação de pureza mais específica desses produtos. O objetivo desse trabalho ajudaria, portanto, a indicar a necessidade da inclusão dessa avaliação na legislação nacional.

2.2 – Objetivos Específicos

Determinar o teor relativo de fragmento $F(ab')_2$ presente nos soros antibotrópicos utilizados pelo Programa Nacional de Imunizações.

Identificar as proteínas presentes nos soros que não contribuem para seu efeito, procurando com isso esclarecer em quais pontos do processo produtivo essas proteínas não são removidas.

Determinar os epítomos presentes em imunoglobulinas eqüinas, para o preparo de anticorpos contra a fração F_c da imunoglobulina eqüina.

Desenvolvimento de anticorpos específicos contra os epítomos selecionados, para a detecção da presença de IgG eqüina em soros antiofídicos.

3 – Metodologia

3.1 – Locais de Execução dos Experimentos

A realização da parte prática da tese deu-se basicamente em quatro laboratórios, a seguir:

- I. Laboratório de Produtos Biológicos - Departamento de Química - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ). Nesse laboratório foram realizadas as análises de eletroforese de proteínas, cromatografia de proteínas, preparo dos conjugados peptídeos toxóide tetânico, inoculação dos animais e ensaio imuno enzimático (ELISA);
- II. Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Instituto Oswaldo Cruz (IOC – FIOCRUZ). Nesse laboratório foram realizadas a predição e o mapeamento de epítomos em imunoglobulinas eqüinas;
- III. As análises de espectrometria de massas foram feitas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro e no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ.

3.2 – Material

3.2.1 – Amostras

Utilizou-se amostras dos soros antibotrópicos do Programa Nacional de Imunizações, de três produtores diferentes, identificados como A, B e C. Analisou-se oito amostras do produtor A, nove do produtor B e treze do produtor C.

Empregaram-se também nos experimentos plasma de cavalo fornecido pelo biotério central da Fiocruz e pepsina, gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Eduardo Ribeiro da Cunha, do IVB.

3.2.2 – Animais

Foram utilizados coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia com cerca de 3 meses de idade e 1,5 Kg de peso, fornecidos pelo biotério central da Fiocruz, e mantidos no serviço de animais de laboratório do INCQS.

3.2.3 – Reagentes

Os reagentes foram fornecidos pela Sigma, GE, Bio-rad e Merck, dentre outros. Os reagentes específicos a determinadas técnicas, serão relacionados conforme forem descritos os procedimentos.

O toxóide tetânico(TT) – proteína carreadora para imunização, foi gentilmente cedido pela Dra Ivna Alana da Silveira (Laboratório de Tecnologia Bacteriana, Bio maguinhos, Fiocruz).

Comprou-se o Peptídeo sintético (PS) GGTWYVDGTEVKTAKTMGG da American Peptide Company (Sunny Valley, Califórnia, EUA) para ser utilizado em experimentos de Elisa e no preparo do conjugado com o TT.

3.3 – Métodos

3.3.1 – Determinação Quantitativa de Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pela técnica de Lowry, modificada para eliminar o efeito de interferentes (DULLEY, 1975; BENSADOUN, 1976). As amostras de soro (1 mL) foram passadas em coluna de dessalinização PD-10 para a remoção do fenol e outros interferentes. A fração com proteínas foi coletada e diluída a 5 mL em frasco volumétrico com água milli-Q. Uma alíquota de 1mL dessa solução foi diluída em frasco volumétrico a 20 mL, totalizando uma diluição de 100 vezes em relação a amostra original.

3.3.2 – Eletroforese de proteínas com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMELI, 1970)

Tomaram-se alíquotas de 10 µL dos soros que em seguida foram diluídas em água milli-Q até o volume de 100 µL. Esse material foi purificado utilizando-se o Kit de preparo de amostras para eletroforese de proteínas (Bio-rad 163-2130), seguindo as instruções do fabricante no seu uso. 10 µL dessas amostras foram aplicados em gel de poliacrilamida à 10% (condições não redutoras) ou 12% (condições redutoras). Os géis obtidos foram digitalizados no densitômetro, com o auxílio do programa Quantity One (Bio-rad). Os valores de peso molecular e o percentual relativo de cada banda foram determinados utilizando funções específicas para esses parâmetros.

3.3.3 – Cromatografia de Afinidade por Cibacron Blue F3G-A

Fez-se a purificação de albumina de cavalo segundo o procedimento clássico específico para esse tipo de proteína do plasma, que é a cromatografia de afinidade com o corante Cibachrom Blue imobilizado na fase estacionária (TRAVIS, 1976).

Esse experimento foi realizado no cromatógrafo líquido de baixa pressão Grad-Frac (GE). A coluna Cibacron F3G-A (Sigma – 54833) foi equilibrada inicialmente com o fase A (50 mM de KH_2PO_4 pH 7,0) num fluxo de 1mL/min. Após o equilíbrio 2 mL de plasma diluído (1:1 com fase A) foram injetados. Ao longo da corrida utilizou-se o seguinte gradiente: 0 – 30 min 100% fase A; 31 – 36 min 0% de fase A até 100% de fase B (50 mM de KH_2PO_4 , 1,5 M KCl pH 7,0); 37 – 47 min 100% de fase B; 48 – 56 min 100% de fase A. Após a corrida, leu-se as frações coletadas em 280 nm no espectrofotômetro e as absorbâncias encontradas foram plotadas no programa Excel 5.0. Dessa forma identificaram-se a fração de proteínas não ligadas a coluna, que eluíram na primeira parte do gradiente, e a fração de proteínas ligadas ao cibacron, que eluíram na segunda fase da corrida. A fração não ligada foi concentrada por ultrafiltração em cartucho com cut off de 50 kDa, obtendo-se um concentrado de imunoglobulinas equínas. A fração ligada foi purificada por cromatografia de fase reversa. Determinaram-se os teores de proteína nas duas frações pelo método de Lowry.

3.3.4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa das Frações Coletadas da coluna Cibacron Blue

Esse experimento foi realizado no cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 (Shimadzu). A coluna C₁₈ (Bio-Rad 125-0551) foi equilibrada inicialmente com 98% de fase A (0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água) e 2% de fase B (0,1% de TFA em 20% de água 80% de acetonitrila (ACN)) num fluxo de 1mL/min. Após o equilíbrio 500 µL de fração ligada foram injetados. Ao longo da corrida utilizou-se o seguinte gradiente: 0 – 5 min 98% fase A; 5 – 40 min 20% de fase A; 40 – 50 min 20% de fase A; 50 – 60 min 98% de fase A; 60 – 70 min 98% de fase A. Monitorou-se a corrida em 220 e 280 nm. A fração correspondente à albumina (29 min) foi coletada manualmente e seca em speed vac. Esse material foi utilizado com um padrão de soro albumina eqüina (ESA).

3.3.5 – Immunoblot

Essa técnica foi utilizada para a identificação das bandas relativas a IgG eqüina presentes nos soros antiofídicos nacionais (RENART, 1979)

Inicialmente as amostras de soros antiofídicos foram submetidas à eletroforese do tipo SDS-PAGE em condições não redutoras. Terminada a corrida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Bio-rad 162-0217), no sistema de transferência submersa Mini Trans-Blot® Cell, durante 60 minutos com corrente constante de 150 mA. Em seguida a membrana foi tratada com tampão de bloqueio (1 % de BSA em PBS) por 1h, lavada três vezes com água, e incubada por uma hora com o anticorpo conjugado à fosfatase, em tampão de bloqueio. Na próxima etapa a membrana foi lavada três vezes com água e foi adicionado o substrato da fosfatase alcalina BCIP/NBT (Sigma 5655). O desenvolvimento de cor foi acompanhado visualmente e a reação foi interrompida pela lavagem com água. As membranas foram então secas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a secagem as membranas obtidas foram digitalizadas no densitômetro GS 800

com o auxílio do programa Quantity One. Os valores de densidade ótica de cada banda foram determinados utilizando funções específicas do programa.

3.3.6 – Eletroforese Bidimensional

Preparo das amostras

A composição das amostras influencia muito a resolução do IEF. Sais interferem no processo de focalização, assim como a presença de bases e ácidos de massa molecular pequena. Para eliminar esses efeitos as amostras dos soros foram submetidas ao kit de purificação de amostras para eletroforese (Bio-rad 163-2130), seguindo as instruções do fabricante no seu uso. Antes da purificação pelo kit, as amostras foram diluídas para que a massa total de proteínas presentes fosse de 100 µg. No final do tratamento o pellet formado foi dissolvido em 125 µL de tampão de amostra.

Condições eletroforéticas

Aplicou-se 125 µL das amostras na cuba do sistema Protean IEF Cell. Colocou-se em seguida sobre cada linha do sistema strips de 7 cm de comprimento, faixa de pH de 3,0 a 10,0 (Bio-rad 163-2000). A focalização isoeletrica ocorreu nas seguintes condições: 1ª Parte: 250V por 20 min, com subida linear. 2ª Parte: 4000V por 2h, com subida linear. 3ª Parte 4000V até atingir um total de 10000V/hora, com subida rápida. Terminada a primeira dimensão, os strips foram preparados para a segunda dimensão com o kit starter para eletroforese bi dimensional (Bio-rad 163-2105). A segunda dimensão foi feita com o gel à concentração de 15%. Os géis foram corados com a solução de coloração Coomassie Bio-safe® (Bio-rad 161-0786) e descoradas por lavagens sucessivas com água milli-Q.

Os géis obtidos foram digitalizados no densitômetro GS 800 com o auxílio do programa PDQuest. Os valores de massa molecular e o ponto isoeletrico de cada spot foram determinados utilizando funções específicas do programa, comparando-se as amostras com um padrão para eletroforese bidimensional (Bio-rad 161-0320). A comparação entre os diferentes géis foi feita utilizando-se função específica do programa.

Os géis foram conservados em ácido acético 10%, temperatura de 2-8°C, para posterior excisão dos spots e tratamento com tripsina.

3.3.7 – Digestão Enzimática dos spots (SIMPSOM, 2002)

Preparo dos spots

Os spots de interesse foram cortados do gel e transferidos e transferidos para tubos de polipropileno de 0,5 mL desprezando-se qualquer excesso de acrilamida.

Os pedaços de gel foram descorados em solução de ACN 50%/bicarbonato de amônio 25 mM pH 8.0 durante 15 minutos em banho de ultra-som. As lavagens foram repetidas até a retirada do corante, utilizando 400µL de cada vez.

Em seguida, os géis foram desidratados por 5 minutos com ACN usando volume suficiente para cobrir o pedaço de gel. A ACN foi removida completamente em *Speed Vac* por 15 minutos.

Hidrólise

A solução de tripsina (Promega V5228A) foi preparada dissolvendo 50µg em 250µL de ácido acético 50 mM (solução estoque 0,2µg/µl). 10µL dessa solução estoque foram diluídos em 90µL de bicarbonato de amônio 50mM, para o preparo de uma solução de trabalho de tripsina. Todo esse procedimento foi realizado em banho de gelo.

10µL da solução de trabalho de tripsina foram acrescentados sobre os pedaços de gel de forma a cobri-los completamente. Os pedaços de gel imersos em solução de tripsina foram mantidos em banho de gelo por 10 min para que a enzima penetrasse no gel sem que se inicie a digestão. Após esse tempo todo o excesso de solução foi removido e adicionou-se 20µL de bicarbonato de amônio 50mM. Os tubos foram então mantidos em banho-maria a 37°C por 18h.

Um pedaço de acrilamida de cada gel foi usado como controle negativo do experimento. Como controle positivo da eficiência da protease foram utilizadas bandas de BSA preparadas por SDS-PAGE.

Extração dos peptídeos

Depois de 18h, os 20µL da solução de bicarbonato foram transferidos para um tubo de polipropileno de 400µL. Os pedaços de gel foram extraídos com 60µL de uma solução aquosa de 5% de TFA, 50% de ACN por 30 min. A solução de extração foi então removida e misturada com os 20µL anteriores. A extração foi repetida mais uma vez e todos os extratos foram combinados no mesmo tubo. O volume das extrações foi então concentrado em *Speed Vac* até cerca de 20µL.

Os tubos com os peptídeos foram guardados à -20°C para posterior análise por espectrometria de massa.

3.3.8 – Espectrometria de massa

Para a identificação dos spots, foi utilizada a técnica do *Peptide Mass Fingerprint* (PMF), com a espectrometria de massas do tipo *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI-TOF).

A matriz utilizada no preparo das amostras foi ácido α -ciano-p-hidroxicinâmico (ACHC). Foi preparada uma solução saturada dessa matriz em água, ACN (1:2) e TFA (0,1%). Essa solução foi misturada com solução dos peptídeos em partes iguais, de modo a ter a relação de 1000 a 10000 vezes mais moléculas de matriz que moléculas de peptídeo. Aplicou-se 0,5 µL dessa mistura em uma porta amostras, que após a secagem cristalizou. Em seguida a amostra foi acidificada com 0,3 µL de uma solução de TFA a 1% e novamente seca.

Para a aquisição dos espectros o espectrômetro foi operado no modo refletido, com detecção para íons positivos. A calibração do equipamento foi feita com kit de peptídeos padrões da Brucker Daltonics. Os espectros foram processados no programa XACQ 4.0 (Brucker Daltonics).

3.3.9 – Identificação dos spots

Fez-se a pesquisa de identificação das proteínas dos spots por intermédio dos programas Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) e protein prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>). Nas buscas foram consideradas as massas monoisotópicas de peptídeos monoprotonados (MH⁺). Considerou-

se também a massa de peptídeos modificados em função da adição de iodoacetamida as cisteínas. Foram considerados também os peptídeos formados pela perda de um sítio de hidrólise por tripsina.

Alguns picos detectados nos espectros de massas que não fazem parte das amostras não foram considerados para fins de identificação; são eles: os picos gerados pela autólise da tripsina (842,51; 1045,56; 2211,1; 2283,18; 2239,13; 2299,17; 2807,3), (PARKER, 1998), hidrólise da queratina humana pela tripsina (897,41; 973,53; 1037,52; 1060,56; 1066,49; 1140,56; 1165,58; 1179,6; 1184,59; 1193,61; 1234,67; 1320,58; 1357,71; 1365,63; 1373,65; 1383,69; 1434,77; 1474,74; 1699,82; 1707,77; 1716,85; 1838,91; 1993,97; 2312,14; 2383,95; 2510,95; 2705,16; 2831,19; 3312,30) (PARKER, 1998) e da matriz.

3.3.10 – Predição de epítopos a partir da estrutura primária

A predição de epítopos a partir da estrutura primária é feita utilizando parâmetros físico-químicos relacionados a características importantes para o caráter antigênico de proteínas (MOLINA et al, 2008). Os principais parâmetros utilizados na predição são a acessibilidade, a solubilidade, a flexibilidade da cadeia e os elementos da estrutura secundária presentes.

A acessibilidade é importante, pois as seqüências na superfície da proteína são disponíveis para a interação com o anticorpo. A principal escala para a determinação de acessibilidade é a escala de Emini (EMINI et al, 1985). Essa escala se baseia em no fato de que resíduos acessíveis devem ser aqueles com uma superfície solvatada pela água maior que 20\AA^2 . Critérios de acessibilidade foram definidos com base em proteínas de estrutura tridimensional conhecida.

A segunda característica importante é a solubilidade da seqüência. Normalmente seqüências com baixa polaridade, ou seja, com vários aminoácidos hidrofóbicos são pouco antigênicas. Seqüências com aminoácidos polares tendem a formar epítopos com maior facilidade (PELLEQUER et al, 1993).

Para a predição de características das seqüências foram estabelecidas várias escalas de solubilidade de aminoácidos. A escala de Kate & Doolittle é bastante utilizada para essa finalidade. Tal escala baseia-se no valor máximo

de 3,0 para os aminoácidos mais polares e o valor mínimo de -3,4 para W (KATE & DOOLITTLE, 1982).

Além da escala de Kate & Doolittle, outras escalas de solubilidade também podem ser utilizadas. A alternativa mais usada é a escala de Parker, que baseia na interação de peptídeos sintéticos com a estrutura geral Ac-GXLLLKK-NH₂, onde X é cada um dos vinte aminoácidos, com uma coluna cromatográfica de fase reversa do tipo C₁₈ (PARKER et al, 1986). Essa escala considera os aminoácidos numa escala de +10 (+ polar D) até - 10 (menos polar W).

A flexibilidade de uma seqüência influencia bastante em seu caráter antigênico. Estudos com várias proteínas demonstraram que as regiões mais flexíveis são também mais antigênicas, pois podem ajustar suas conformações permitindo a formação do complexo antígeno-anticorpo (PELLEQUER et al, 1993).

A flexibilidade é avaliada pela escala de Karplus e Schultz (KARPLUS & SCHULTZ, 1985). Nessa escala os aminoácidos foram divididos em dois grupos, o primeiro com cadeia lateral flexível e o segundo com cadeia lateral rígida (A, L, H, V, Y, I, F, C, W e M). Cada aminoácido pode ter três valores diferentes de flexibilidade, dependendo dos resíduos em sua vizinhança. O primeiro valor corresponde à ausência de resíduos rígidos nas duas posições próximas na seqüência. O segundo valor deve-se a presença de um resíduo rígido e o terceiro a dois. A vantagem dessa escala é que ela leva em consideração o ambiente no qual a cadeia lateral se encontra, não apenas as suas características intrínsecas.

Os elementos de estrutura secundária também são extremamente importantes na predição. Escalas para a predição das prováveis conformações locais a partir da estrutura primária foram desenvolvidas por alguns autores.

A escala de Chou & Fasman (CF) baseia-se na freqüência em os aminoácidos ocorrem em estrutura secundárias. A partir dessa seqüência foi estabelecida uma escala de probabilidade de uma seqüência primária gerar uma estrutura de alfa hélice, folha beta ou alça (CHOU & FASMAN, 1974).

A escala de Garnier, Osguthorpe & Robson (GOR) se baseia na comparação da seqüência em estudo com as seqüências de 38 proteínas com estrutura tridimensional altamente resolvida. Cada aminoácido recebe um valor de probabilidade para gerar uma estrutura secundária (GARNIER et al, 1978).

Escalas de Antigenicidade Utilizadas

Os parâmetros anteriormente mencionados podem ser correlacionados levando a escalas de antigenicidade. Cada escala de antigenicidade correlaciona alguns desses fatores, conferindo a cada um deles um peso relativo. Os picos de valores de antigenicidade na estrutura primária correspondem aos prováveis epitopos.

Escala de Jameson e Wolf

Essa escala foi criada estabelecendo-se um peso relativo para cada um dos parâmetros anteriores descritos (JAMESON & WOLF, 1986). O índice de antigenicidade (A_i) de cada aminoácido na seqüência será dado pela fórmula abaixo:

$$A_i = \sum 0,3H + 0,15S + 0,15F + 0,2(CF) + 0,2(GOR)$$

Onde:

H: solubilidade (Kyte e Doolittle)

F: flexibilidade (karplus e Schultz)

S: acessibilidade (Emini)

CF: estrutura secundária (Chou e Fasman)

GOR: estrutura secundária (Garnier, Osguthorpe & Robson)

Nesse trabalho a predição pela escala de Jameson e Wolf foi feita utilizando uma função Protean do programa DNA star.

Escala de Kolaskar

A escala de Kolaskar prediz epitopos utilizando parâmetros físico-químicos e também a freqüência de ocorrência de aminoácidos em epítomos validados experimentalmente (KOLASKAR TONGAONKAR, 1990). Cada aminoácido recebe um valor de propensão a antigenicidade que é dado pela fórmula:

$$A_p = \frac{f_{ag}}{f_s}$$

onde:

A_p : Propensão a antigenicidade

f_{ag} : freqüência da ocorrência do aminoácidos em epítomos.

f_s : freqüência da ocorrência do aminoácido na superfície da proteína. Essa freqüência é determinada utilizando-se os valores de H (Parker), F (Karplus) e S (Emini).

Nesse trabalho a predição pela escala de Kolaskar foi feita utilizando serviço livre disponível em http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input.

Escala Bepipred

A escala bepiped prediz epítomos de forma semelhante à escala de Kolaskar, ou seja, são associados parâmetros físico-químicos e a freqüência de ocorrência de aminoácidos em epítomos (LUND et al, 2006). As principais diferenças entre os métodos são a escala de freqüência epítomos utilizada, que é a AntiJen, e o uso do parâmetro físico químico de Levitt (LEVITT, 1978) que estabelece uma correlação entre as estruturas primária e secundária de uma proteína.

Nesse trabalho a predição pela escala Bepiped foi feita utilizando serviço livre disponível em http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input.

3.3.11 – Alinhamento de Seqüências

O alinhamento manual de seqüências das cadeias pesadas das imunoglobulinas eqüinas com a cadeia pesada da imunoglobulina de coelho foi feita utilizando o programa Bio edit.7.0.9.0.

3.3.12 – Modelagem Molecular por Homologia

A modelagem molecular de proteínas por homologia baseia-se na comparação da seqüência em estudo com as seqüências de proteínas que já tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas por métodos experimentais, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e difração de raios X. Existindo a

homologia entre as seqüências, programas de computador criam o modelo tridimensional da proteína em estudo. Esse modelo será tanto melhor quanto maior for à similaridade na seqüência entre a proteína modelo e a proteína alvo que se pretende modelar (ALENCASTRO & SANTOS FILHO, 2003). O modelo gerado pelo programa deverá ser validado. A validação consiste da comparação entre o modelo gerado e parâmetros próprios da estrutura de proteínas.

A modelagem do isotipo IgG3 da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina foi feita por homologia, utilizando como modelo a estrutura cristalográfica de uma imunoglobulina humana (código de acesso do PDB H1z), que foi a proteína que mostrou maior identidade na seqüência com a IgG3 eqüina. As seqüências dessas proteínas foram alinhadas manualmente no Swiss PDB viewer e o serviço Swiss Model do expasy (<http://www.expasy.org/>) foi utilizado para a geração do modelo tridimensional (SCHWEDE et al, 2006).

A avaliação do modelo tridimensional foi feita na página <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/> , utilizando os programas PROCHEK (LASKOWSKI et al, 1993) e VERIFY 3D (LÜTHY et al, 1992).

3.3.13 – Mapeamento de epítomos por síntese paralela de peptídeos em membrana de celulose (Spot Síntese)

A evolução da determinação de epítomos por síntese de peptídeos foi o desenvolvimento da técnica de spot síntese, que tornou mais simples e direta a determinação dos epítomos presentes em proteínas. Nessa técnica os peptídeos são preparados diretamente em uma membrana, onde será realizada a reação antígeno–anticorpo (FRANK, 1992)

O mapeamento de epítomos por spot síntese de peptídeos consiste de duas etapas. Na primeira é preparada a membrana com peptídeos correspondentes a trechos da seqüência da proteína que se pretende estudar. Na segunda etapa essa membrana é revelada com um soro policlonal ou anticorpo monoclonal que reconhecerá os peptídeos correspondentes a epítomos reativos (FRANK, 2002).

Seleção das seqüências para a síntese

A seqüência utilizada para programar a síntese foi do gene IgG3 da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina. A seleção das seqüências foi feita utilizando o programa do sintetizador INTAVIS. Foram preparados peptídeos de quinze aminoácidos, avançando cinco aminoácidos de cada vez. Esse procedimento gerou 69 seqüências ao todo.

Material utilizado

Os aminoácidos para síntese de peptídeos utilizados foram fornecidos pela Calbiochem. Os seguintes aminoácidos foram utilizados na forma protegida por F-moc no grupo amina: alanina, glicina, isoleucina, Leucina, fenilalanina, triptofano, valina e metionina. Os seguintes aminoácidos além de protegidos por F-moc foram utilizados na forma protegida por trifenil metano (tritol) na cadeia lateral: asparagina, cisteína, glutamina, e histidina. Os seguintes aminoácidos além de protegidos por F-moc foram utilizados na forma protegida por t-Bu na cadeia lateral: treonina, serina, glutamato e aspartato. A arginina além de protegida por F-moc tinha a proteção Pmc na cadeia lateral. A lisina além de protegida por F-moc tinha a proteção de Boc na cadeia lateral.

Os spots foram sintetizados em uma membrana Intavis, pré ativada com beta alanina

Procedimento (LAUNE et al, 2002)

Cada Fmoc aminoácido foi dissolvido em N-metil-pirrolidona (NMP). A ativação dos Fmoc aminoácidos foi feita misturando-se soluções de DIC e o HOBt em NMP, atingindo a razão molar 1 FmocAA:2 DIC/HOBt. No primeiro acoplamento a membrana com o FmocAA ativado por 20 min. Após esse tempo a membrana foi lavada três vezes com dimetil formamida (DMF), e a membrana foi tratada com uma solução de anidrido acético em DMF (10% v/v), para a inativação dos grupos amina livres da betalanina que não reagiram. A desproteção do primeiro Fmoc foi feita pelo tratamento com uma solução de piperidina em DMF (20% v/v) por 8 min e em seguida a membrana foi lavada com etanol três vezes, por 2 min cada vez. Após secagem ao ar iniciaram-se os ciclos de acoplamento e desproteção até a formação dos peptídeos de quinze aminoácidos. Na etapa final os grupos de proteção das cadeias laterais foram removidos pelo tratamento com uma solução de TFA em dicloro metano

(DCM) (1:1 v/v), com 2,5% de triisopropil silano. A desproteção foi seguida de três lavagens com DCM, três lavagens com DMF e três com etanol. A membrana foi seca ao ar antes da revelação com anticorpos.

Como um controle do processo de síntese das membranas, foram preparados spots com duas seqüências de 14 resíduos de aminoácidos, previamente identificados como reações positivas (epitopo V5 encontrado na proteína V e P de paramixovirus SV5) (SOUTHERN et al, 1991).

Revelação das membranas (FRANK, 2002)

As membranas preparadas por spot síntese foram reveladas da seguinte maneira. Inicialmente as membranas foram bloqueadas com uma solução de BSA em BSA tween por 30 min. Após o bloqueio as membranas foram lavadas com PBS/tween. A incubação foi feita então com o soro policlonal de coelho (Sigma, A6360) por uma hora. O excesso de anticorpo foi lavado com PBS/tween por 30 min. Após essa lavagem foi adicionado o reagente CDP *start*® (Applied Biosystems, MSC2000), diluído em tampão na concentração de 0,25 mM. Sobre a membrana foi então colocado um filme de raio X por 5 min. Findo esse tempo o filme de raio X foi revelado utilizando o revelador/reforçador GBX (Kodak 6360119) e o fixador/reforçador GBX (Kodak, 6493068). Os filmes de raios-X obtidos foram digitalizados no densitômetro GS 800 com o auxílio do programa Quantity One, utilizando uma função específica do programa para a digitalização desse tipo de material. Os valores de densidade ótica de cada spot foram determinados utilizando função específica do programa.

3.3.14 – Preparo de conjugados TT-PS

Peptídeos podem ser antigênicos, ou seja, podem formar complexos com anticorpos pré-existentes. Porém devido a seu baixo peso molecular, peptídeos não têm epítomos para células B e T simultaneamente. Logo peptídeos não são imunogênicos, ou seja, eles não ativam de forma eficiente a imunidade de um animal (MELOEN et al, 2001). Um dos processos para tornar peptídeos imunogênicos é a conjugação (formação de ligação covalente) com um antígeno protéico, contornando o problema da falta de imunogenicidade (TAM, 1993).

Nesse trabalho a conjugação foi feita usando o TT como proteína carreadora, e o método da conjugação por etil-N,N-dimetil-propil carbodiimina (EDC), que é do tipo espaçador zero (KOSHLAND, 1967). Essa conjugação foi realizada adaptando-se um procedimento utilizado no acoplamento de proteínas (GRABAREK & GERGELY, 1990).

O EDC é uma carbodiimina solúvel em água. Ele ativa rapidamente os grupos ácidos presentes no TT, formando o intermediário reativo O-acil uréia. Devido a grande reatividade do intermediário é adicionado ao meio N-hidroxi succinimida (NHS), que forma um éster intermediário ($t_{1/2} = 40$ min) (VIJAY & SEHGAL, 1994) que é menos susceptível a hidrólise que a O acil uréia ($t_{1/2} = 3$ s) (GRABAREK & GERGELY, 1990). Após a formação do éster intermediário de NHS é adicionado o peptídeo sintético (PS), que conjuga com a proteína pelo seu N-terminal.

Adicionou-se 140 μ L de uma solução de 6,4 mg/mL de EDC a 1 mL de uma solução de 3,5 mg/mL de TT em PBS pH 6. Após 30 min foram adicionadas 40 μ L de uma solução 1 mg/mL de NHS e depois de 30 min 320 μ L de betamercaptoetanol, para inativar o excesso de EDC. Depois de 15 min, adicionou-se 2,4 mg do PS dissolvido em 500 μ L uma mistura de 10% de ACN em água. A mistura foi mantida a temperatura de 2-8°C por 24h. Findo esse tempo a mistura reacional foi purificada em coluna PD-10 (GE). Os tubos coletados foram lidos no espectrofotômetro em 280 nm. A fração que continha o conjugado foi concentrada em speed vac, evitando a secagem completa do líquido dos tubos.

3.4.15 – Avaliação da conjugação TT-PS por CLAE

Acompanhou-se a conjugação TT-PS por CLAE, com coluna de gel filtração, através da avaliação do peso molecular do conjugado formado (LI et al, 2008). Experimento foi realizado no 100 μ L do conjugado foram injetados em uma coluna TSK SW_{xl} 3000 (Tosohaas, 08541), previamente equilibrada com PBS 100 mM, pH 7,0 num fluxo de 0,6 mL/min. Monitorou-se a corrida cromatográfica em 214 nm e 280 nm. Utilizaram-se as seguintes proteínas para a calibração da coluna: Tireoglobulina (660 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa). A curva de peso molecular foi

determinada pelo plot dos tempos de retenção padrões contra o logaritmo peso molecular na planilha excel 5.0.

3.4.16 – Imunização dos coelhos com os conjugados TT–PS

Utilizaram-se coelhos para a preparação de anti-soro, com um protocolo de imunização previamente descrito para conjugado peptídeo sintético - proteína (GU & HOU, 2003).

O esquema de imunização dos animais é mostrado na tabela 11. O conjugado foi dissolvido em PBS pH 6,0 e emulsionado em seringa com os adjuvantes imediatamente antes da aplicação. A inoculação foi feita em cinco pontos diferentes do dorso dos animais, para reduzir os efeitos locais do adjuvante.

O sangue dos animais foi coletado pela veia marginal da orelha, no primeiro dia, no dia 42 e 21 dias após a última inoculação. O plasma foi separado por coagulação e guardado a -20°C antes do uso.

Tabela 11: Esquema de imunização dos coelhos com o conjugado PS-TT

| Dose | Número de coelhos | Conjugado | Volume | Adjuvante | Dia |
|----------------|-------------------|---------------|--------|-------------------|-----|
| 1 ^a | 02 | 500 µg/500 µL | 500 µL | Freund completo | 01 |
| 2 ^a | 02 | 500 µg/500 µL | 500 µL | Freund incompleto | 21 |
| 3 ^a | 02 | 500 µg/500 µL | 500 µL | Freund incompleto | 42 |

3.4.17 – ELISA

O método ELISA (do inglês *Enzyme linked immunosorbent assay*), foi utilizado em experimentos para validar em solução epítipo determinado por spot síntese. O Elisa também foi utilizado para acompanhar a soro conversão dos coelhos imunizados com o conjugado TT-PS. (LUCAS et al, 2004)

Planejamento fatorial

Para facilitar o estabelecimento de condições ideais para a realização do Elisa, foi feito um planejamento fatorial utilizando o programa Statistica 8.0 (MONTGOMERY & CALADO, 2003). Esse planejamento fatorial completo foi de dois fatores em três níveis. Os fatores avaliados foram a concentração de antígeno e de anticorpo primário. Os níveis de concentração de antígeno estudados foram 80, 160 e 320 µg/mL. Os níveis de diluição de anticorpo primário testados foram 1:10.000; 1:20.000 e 1:30.000. Os resultados do planejamento ajudaram a estabelecer as condições que foram utilizadas no procedimento a seguir.

Condições específicas

Elisa de competição

Utilizou-se microplacas com 96 poços (Corning 25802). Adicionou-se 50 µL de IgG eqüina na concentração de 80 µg/mL, em tampão de sensibilização (Na_2CO_3 0,016M, NaHCO_3 0,034M/ pH 9,6) e sensibilizou-se a placa por 1 hora a 37°C. Após esse tempo lavou-se 3 vezes com tampão PBS-TWEEN (Sigma P 3563). Adicionou-se 50 µL do anticorpo primário (sigma A6069) (2 µL em 30 mL de tampão de incubação) misturado ao PS em tampão de incubação (0,5% BSA; 5% de TWEEN 20, 2% de Soro bovino adulto, em PBS). Várias concentrações de PS foram usadas. A incubação foi feita por 30 min a 37°C. Após esse tempo lavou-se 3 vezes com tampão PBS-TWEEN. Adicionou-se 100 µL de substrato (solução 1mg/mL de PNPP Sigma N 9389) em glicina 0,1M, 1 mM MgCl_2 , 1mM ZnCl_2 /pH10,4) e a placa foi guardada ao abrigo da luz por 30 min. Após esse tempo a placa foi lida em 405 nm. As absorbâncias foram lançadas na planilha Excel 5.0.

Elisa para a determinação da soro conversão em coelhos

Utilizou-se microplacas com 96 poços. Adicionou-se 50 µL de IgG eqüina na concentração de 80 µg/mL e sensibilizou-se a placa por 1 hora a 37°C. Após esse tempo lavou-se 3 vezes com tampão PBS-TWEEN. Adicionou-se 50 µL do anticorpo primário (várias diluições do soro dos coelhos) em tampão de incubação e incubou-se por 18h a 4°C. Após esse tempo lavou-se 3 vezes com tampão PBS-TWEEN. Adicionou-se então 50 µL de anticorpo anticoelho conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) e incubou-se por 3h a 37°C. Adicionou-se 100 µL de substrato e a placa foi guardada ao abrigo da luz por 30 min. Após esse tempo a placa foi lida em 405 nm. As absorbâncias foram lançadas na planilha Excel 5.0.

4 – Resultados

4.1 – Avaliações da Pureza de Soros Antiofídicos

4.1.1 – Teor de Proteínas

Foram analisados os SAB dos três principais fornecedores nacionais. O SAB foi utilizado por ser o soro antiofídico mais largamente utilizado no país. No total foram analisados oito lotes do produtor A, nove lotes do produtor B e 16 lotes do produtor C. Esses quantitativos correspondem a aproximadamente o fornecimento de cada um dos fabricantes ao PNI, no período de doze meses.

Na tabela 10 são resumidos os valores do teor de proteínas dos três produtores nacionais. Todos os lotes avaliados têm um teor muito abaixo do máximo permitido pela F.B. (15 g/dL) As médias encontradas para os produtores foram 4,3 g/dL para o produtor A, 3,2 g/dL para o produtor B e 2,7 g/dL para o produtor C. É interessante destacar que apesar do produtor A ter o maior valor absoluto, o desvio padrão entre os valores do lotes é o menor (0,6). O produtor B tem um valor de desvio padrão relativamente alto (1,0). O produtor C teve um lote que ficou com um valor muito acima dos demais (5,3 g/dL), elevando o desvio padrão (0,8). Se esse lote fosse excluído do cálculo, esse produtor teria a menor média (2,5 g/dL) e o menor desvio padrão (0,4).

A título de comparação, são mostrados na tabela 12 os teores de proteínas de soros produzidos em outros países. Os soros nacionais têm um teor de proteínas abaixo de outros produtos, mesmo alguns que utilizam tecnologia semelhante, ou seja, precipitação pelo SA e digestão por pepsina.

Tabela 12: Teor de proteínas nos soros Brasileiros e de produtores de outros países

| Produtor | Teor (g/dL) | Referência |
|---------------------------|--------------------|-----------------------|
| A ⁽¹⁾ | (4,3 ± 0,6) | - |
| B ⁽¹⁾ | (3,2 ± 1,0) | - |
| C ⁽¹⁾ | (2,7 ± 0,8) | - |
| ICP | 4,4 ⁽²⁾ | GUTIERREZ et al, 1999 |
| | 8,3 ⁽³⁾ | |
| Wyeth ⁽⁴⁾ | 2,1 | DART & McNALLY, 2001 |
| Protherics ⁽⁵⁾ | 1,5 | |
| Egito | 4,7 ⁽⁶⁾ | REDWAN, 2006 |
| | 3,6 ⁽⁷⁾ | |
| Pasteur | 5,0 ⁽⁸⁾ | LANG et al, 1998 |

(1) Preparado por precipitação com SA e digestão por pepsina; (2) Preparado por precipitação com AC; (3) Preparado por precipitação com AS; (4) Preparado por precipitação com SA e cromatografia de troca iônica. (5) Animal soro produtor é o carneiro. Preparado por precipitação com Sulfato de sódio, hidrólise por papaína e cromatografia de afinidade (ligante veneno). (6) Preparado por precipitação por SA e hidrólise por pepsina; (7) Preparado por precipitação por AC, hidrólise por pepsina; (8) Atual Aventis; Preparado por precipitação com SA e hidrólise por pepsina. Produto fabricado na França, com venenos de serpentes africanas.

4.1.2 – Determinação do Teor de F(ab')₂

A abordagem usada para a avaliação da pureza dos soros foi o SDS-PAGE, com gel na concentração de 10%, em condições não redutoras. Essa é a condição sugerida na F.E. V Ed. e foi utilizada por outros autores para avaliar a pureza de soros (GUTIEREZ et al, 1999; RATANABANONGKOON & RAWEEERITH, 2003; MORAIS & MASSALDI, 2005).

Os géis resultantes das análises por eletroforese são mostrados na Figura 12. Na avaliação inicial pode-se notar que todos os lotes têm mais de uma banda protéica. O número de bandas e a intensidade de cada uma variam bastante de acordo com o lote.

A principal banda em todas as amostras apresentou um formato largo, com um peso molecular de 90 kDa. Essas características são semelhantes às descritas para F(ab')₂ preparado a partir de imunoglobulina eqüina (GUTIEREZ, 1999; RATANABANONGKOON & RAWEEERITH, 2003; MORAIS & MASSALDI, 2005) e ovina (JONES & LANDON, 2002). O peso molecular de 90kDa deve-se a perda da fração F_c, devido à proteólise pela pepsina. O aspecto difuso da banda deve-se provavelmente a alguns fatores. O primeiro é a variação do isotipo de cadeia leve, que é pequena, mas ocorre. Variações de isotipo também ocorrem na cadeia pesada, provocando diferenças na extensão do C_{H1} e principalmente da região da dobradiça (WAGNER et al, 2002). A última causa são as variações no número de aminoácidos das regiões V_L e V_H (ALMAGRO et al, 2006), devido a grande variedade de antígenos presentes nos venenos, que os soros devem neutralizar.

Para uma avaliação quantitativa do teor de F(ab')₂ presente, todos os géis foram submetidos a densitometria (figuras 12a, 12b e 12c). Os resultados dos teores de cada banda e os pesos moleculares correspondentes são sumarizados na tabela 13.

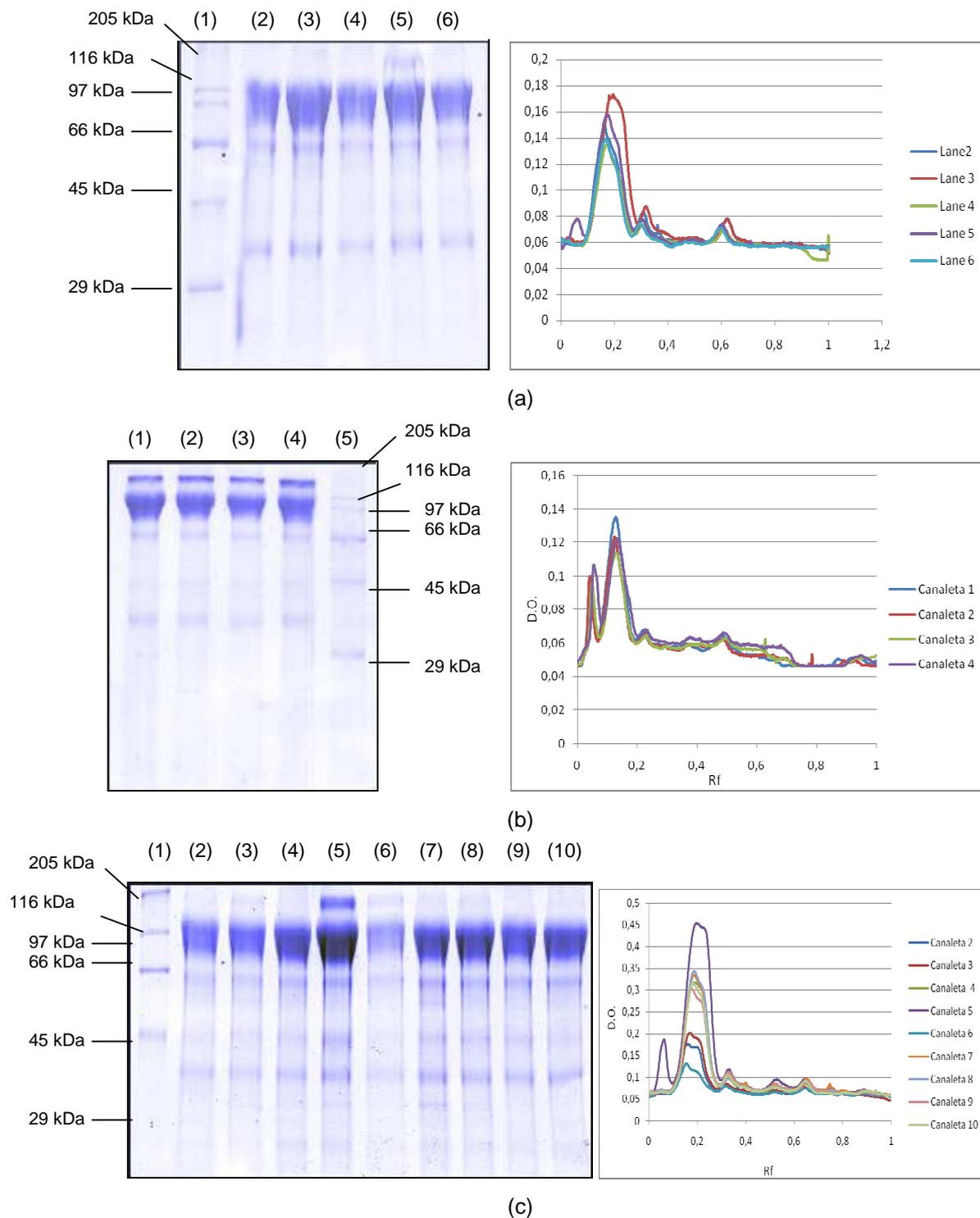


Figura 12: Análises de SDS-PAGE (10%) em condições não redutoras dos soros antiofídicos nacionais. A esquerda é mostrada a imagem do gel e a direita a análise por densitometria. (a) Gel com amostras de lotes do produtor A; Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular, nas canaletas de 2 até 6 foram aplicados diferentes lotes (b) Gel com amostras de lotes do produtor B; nas canaletas de 1 até 4 foram aplicados diferentes lotes Produtor (B), na última canaleta foi aplicado o mesmo padrão de peso molecular (c) Gel com amostras de lotes do produtor C; Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular, nas canaletas de 2 até 10 foram aplicados diferentes lotes

Tabela 13: Peso molecular e teores relativos das bandas dos géis mostrados na figura 12.

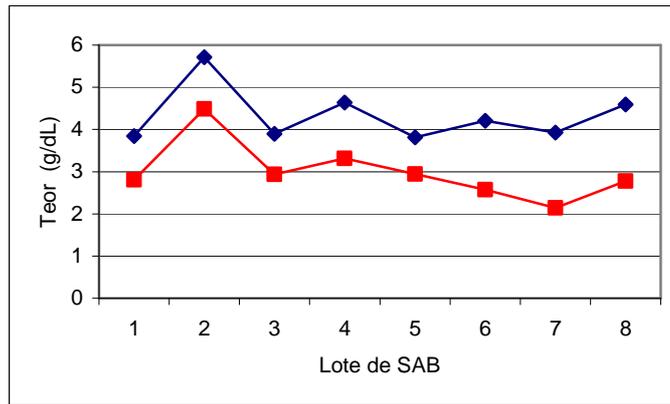
| Produtor | A (L = 8) | | | B (L = 9) | | | C (L = 16) | | |
|----------|-----------|-------------|---|-----------|-------------|---|------------|-------------|----|
| Banda | PM (kDa) | Teor (%) | n | PM (kDa) | Teor (%) | n | PM (kDa) | Teor (%) | n |
| 1 | - | - | - | 12 | 9,7 | 1 | - | - | - |
| 2 | - | - | - | 24 | 1,2 | 2 | - | - | - |
| 3 | 30 | 8,2 | 3 | 32 | 6,2 | 5 | 31 | 1,5 | 2 |
| 4 | 36 | 12,2 | 8 | 36 | 10,5 | 9 | 38 | 5,6 | 16 |
| 5 | - | - | - | 42 | 3,1 | 7 | 43 | 7 | 11 |
| 6 | - | - | - | 48 | 4,7 | 7 | - | - | - |
| 7 | - | - | - | 59 | 2,5 | 2 | - | - | - |
| 8 | 65 | 12 | 8 | 63 | 11,7 | 9 | 64 | 8,7 | 16 |
| 9 | 98 | 75,1 | 8 | 92 | 55,3 | 9 | 91 | 81,3 | 16 |
| 10 | 152 | 3,5 | 4 | 145 | 14,3 | 7 | 150 | 7 | 2 |

Na primeira linha é indicado para cada produtor o número de lotes (L) analisados. As bandas foram numeradas em ordem crescente de PM. O teor e o PM para cada banda são as médias dos valores dos diferentes lotes. A coluna n para cada produtor indica em quantos lotes aquela banda foi detectada. O somatório da coluna de Teor não é 100% devido a diferença de frequência na ocorrência dos contaminantes.

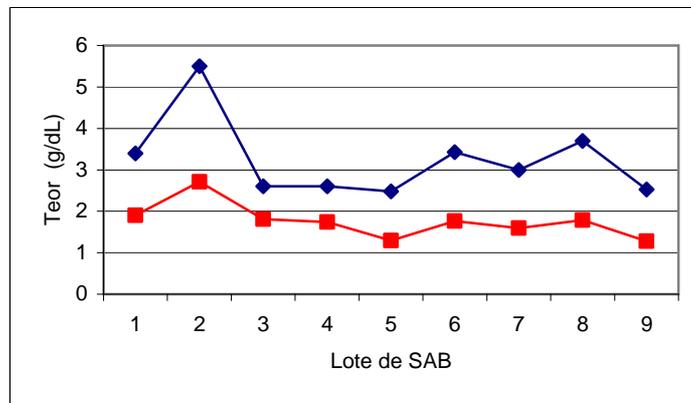
Esses resultados levaram a algumas constatações. O produtor C tem o maior teor relativo de $F(ab')_2$, seguindo em ordem pelos produtores A e B. É importante destacar que os valores são médias e que há uma variação do teor relativo de $F(ab')_2$ entre os diversos lotes. O DP do teor de $F(ab')_2$ dos diversos lotes foi de 9,1% para o produtor A, de 7,8% para o produtor B e 6,5% para o produtor C. É interessante destacar que o produtor B tem um desvio padrão relativo maior para o teor de proteínas que os demais.

Para uma melhor visualização dessas diferenças foram preparados os gráficos mostrados na figura 13. Nesses gráficos são mostrados o teor de proteínas e do teor de $F(ab')_2$, expresso em concentração, calculado a partir da concentração de proteínas, para todos os lotes de produtos analisados.

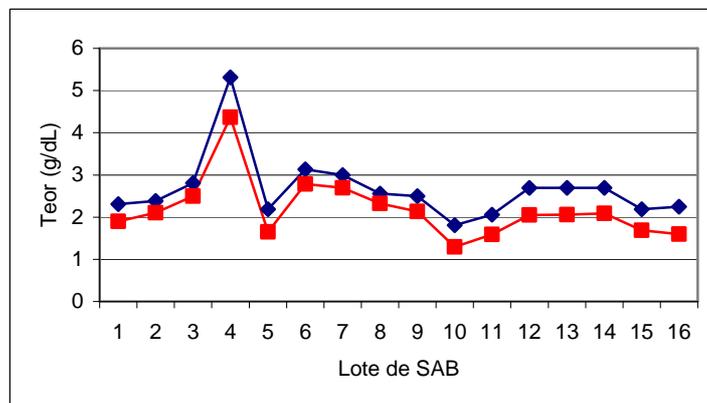
A avaliação dos gráficos mostra que para o produtor C o teor de $F(ab')_2$ mantém uma proporção relativamente constante em relação ao teor de proteínas. No produtor A ocorre um desvio maior entre os dois valores, o que se acentua no produtor B. Essas diferenças sugerem uma maior regularidade no processo de purificação do produtor C, se comparado a A e B.



(a)



(b)



(c)

Figura 13: O teor de proteínas e teor de $F(ab')_2$ dos SABs analisados. (a) distribuição dos teor para o produtor A; (b) distribuição dos teores para o produtor B; (c) distribuição dos teores para o produtor C. A linha em azul é o teor de proteína total. A linha em vermelho é a concentração de $F(ab')_2$

É interessante avaliar a diferença entre o teor total de proteína e a fração ativa no “pior caso”. O pior caso seria uma vítima de acidente botrópico grave ser tratada com um dos lotes de maior teor de proteínas. O paciente receberá 12 ampolas de soro (tabela 06), o corresponde para o produtor A à 5,6g de proteína heteróloga (aproximadamente 4,0g de material ativo), 6,6g (3,2g de ativo) no produtor B e 6,4g (5,2g de ativo) para o produtor C.

No caso dos produtores A e C aparentemente nesses lotes a resposta dos cavalos a imunização foi um pouco mais baixa que nos demais lotes, sendo necessária uma maior concentração de proteínas para a neutralização do veneno. No caso do produtor B ficou clara a necessidade de melhora no processo de purificação do plasma.

Para compararmos o processo produtivo nacional com o de produtores internacionais, é mostrada abaixo uma tabela com valores de teor de $F(ab')_2$ de fabricantes de outros países (Tabela 14). Os resultados mostram que o teores relativos de $F(ab')_2$ dos produtores A e C são semelhantes ao de produtor (IPSER) que também utiliza um processo baseado em precipitação com sulfato de amônio e hidrólise com pepsina. Teores relativos de $F(ab')_2$ mais elevados são atingidos nos fabricantes que utilizam processos de cromatografia de troca iônica ou de afinidade (Protherics, MicroPharm e Aventis).

Tabela 14: Comparação dos teores relativos de $F(ab')_2/F(ab')$ com os dados da literatura

| Produtor | Teor de $F(ab')_2$ | Referência |
|---------------------------|--------------------|---------------------------|
| A ⁽¹⁾ | (75 ± 9)% | - |
| B ⁽¹⁾ | (55 ± 8)% | - |
| C ⁽¹⁾ | (81 ± 6)% | - |
| IPSER ⁽¹⁾ | 82% | PÉPIN-COVATTA et al, 1997 |
| Aventis ⁽²⁾ | 91,6% | |
| MicroPharm ⁽³⁾ | 96% | JONES & LANDON, 2002 |
| Protherics ⁽⁴⁾ | 98% | DART & McNALLY, 2001 |

⁽¹⁾ Purificado por precipitação por SA e digestão por pepsina; ⁽²⁾ Purificado por precipitação por SA e cromatografia de troca iônica; ⁽³⁾ Animal soro produtor é o carneiro. Purificado por hidrólise com pepsina e cromatografia troca iônica; ⁽⁴⁾ Animal soro produtor é o carneiro. Purificado por hidrólise com papaína e cromatografia de afinidade.

4.1.3 – Avaliação dos Contaminantes

Análise detalhada dos géis da figura 12 mostra que além do $F(ab')_2$, há em todas amostras bandas com peso molecular diferente do esperado para esse componente. Seguindo as especificações da F.E. V Ed., essas proteínas a princípio não deveriam estar presentes em uma concentração acima de 10% da concentração total.

Uma banda com aproximadamente 150 kDa ocorre em vários lotes, principalmente do produtor B. Essa banda é associada a presença de imunoglobulinas que não foram completamente hidrolisada pela pepsina (JONES & LANDON, 2002; RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2003; MORAIS & MASSALDI, 2005). A IgG contribui para o efeito protetor dos soros, porém sua participação nos efeitos adversos também é muito grande (WARRELL et al, 1993).

Uma banda com peso molecular de na faixa de 62-64 kDa (tabela 13, banda 08) foi observada em todas as amostras, com intensidade variável entre os diferentes lotes. Uma banda semelhante foi observada em outros trabalhos com soros antiofídicos (JONES & LANDON, 2002; RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2003; GUTIERREZ et al, 2005) e nesses artigos é associada à presença de albumina.

Foi freqüente também a presença de bandas de 48 kDa e 42 kDa. Essas bandas são associadas por outros autores à presença de F_c e $F(ab')$ (JONES & LANDON, 2002; RATANABANANGKOON & RAWEEERITH, 2003; MORAIS & MASSALDI, 2005), produtos da hidrólise da IgG.

Uma outra banda, na faixa de 36-38 kDa, está presente em todas as amostras analisadas. Em outro trabalho (JONES & LANDON, 2002) essa banda é atribuída a presença de resíduos da pepsina utilizada na conversão da IgG em $F(ab')_2$.

Além dessas bandas, que são as principais fora o $F(ab')_2$, outras, de peso molecular mais baixo e menor intensidade, também estão presentes, principalmente no produtor B.

A identificação de forma mais precisa desses contaminantes é importante para certificar as identidade dessas proteínas e para termos uma avaliação de quais pontos do processo de produção do soro esse material não foi removido.

A primeira estratégia para a identificação das demais bandas presentes nas amostras de soros foi à comparação com padrões das prováveis proteínas, a pepsina e a albumina. A pepsina utilizada foi cedida por um fabricante, porém não havia um padrão de soro albumina eqüina (ESA) disponível.

Esse padrão foi preparado usando a técnica clássica para o isolamento de albuminas do plasma de animais, que é a cromatografia de afinidade com o corante cibacron blue como ligante (TRAVIS et al, 1976). A fração correspondente a albumina foi purificada em seguida por cromatografia de fase reversa, conforme mostrado na figura 14, para remover outras proteínas minoritárias que se ligam a Cibacron.

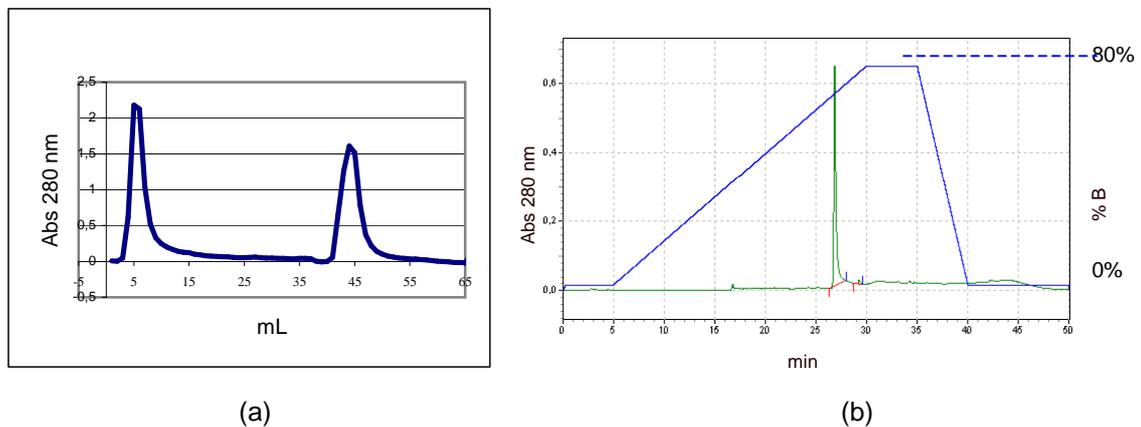


Figura 14: Preparo de padrão de ESA a partir do plasma eqüino. (a) Cromatografia de afinidade do tipo cibacron blue (b) fase reversa da fração ligada na cromatografia de afinidade.

Para uma comparação com as bandas dos géis mostrados na figura 12, a pepsina comercial e a ESA preparada a partir do plasma foram analisadas por SDS-PAGE, conforme mostrado na figura 15. A ESA se apresentou como uma banda larga, com 66 kDa. A pepsina comercial também demonstrou ser uma banda larga, com 41 kDa. Esse PM é compatível com o pepsinogenio, zimogênio correspondente a pepsina, que é ativado em pH ácido (ICHIHARA et al, 1985). A forma ativa da pepsina tem PM de 38 kDa. Esses resultados mostraram semelhança com duas bandas presentes em várias amostras, com pequenas variações no PM encontrado.

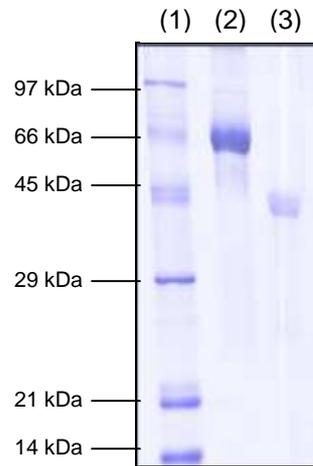


Figura 15: Gel de padrões de ESA e pepsina. A primeira canaleta é um padrão de proteínas de baixo peso molecular, a segunda canaleta é a ESA coletada da fase reversa e a terceira canaleta é pepsina comercial, cedida por fabricante de soro antiofídico.

O gel mostrado na figura 15 foi feito em condições redutoras. A avaliação nessas condições pode levar a mudanças na forma das bandas e conseqüentemente na avaliação de peso molecular. Tal efeito pode justificar as diferenças observadas entre esse gel e os géis mostrados na figura 12. Por esse motivo, reavaliemos as amostras anteriores em condições redutoras.

Os perfis eletroforéticos são bastante diferentes em condições redutoras, conforme mostrado na figura 16. Em condições redutoras as principais bandas deslocam-se de um valor de cerca de 100 kDa para uma faixa de cerca de 30kDa. (tabela 15) A primeira banda, com aproximadamente 32 kDa é associada por outros autores a fração da cadeia pesada que permanece no $F(ab')_2$ (V_H+C_{H1}). A segunda banda, com cerca de 29 kDa é associada a cadeia leve (MORAES & MASSALDI, 2005).

Nos lotes anteriores em que havia bandas de 150 kDa, apareceram bandas com peso molecular de 51-55 kDa. Esse resultado é mais um indicativo que as bandas de 150 kDa correspondem a IgG, e as bandas formadas em condições redutoras correspondem a cadeia pesada.

Nessas condições, na maioria das amostras, as bandas de 62-64 kDa desaparecem ou se tornam muito pouco intensas. Esse efeito não foi observado com o padrão de ESA (fig. 15), demonstrando que as bandas que acreditávamos ser a ESA poderiam não ser efetivamente essa proteína.

Em condições redutoras também foi observada uma banda com peso molecular de 23 kDa, que não estava presente nos géis em condições nativas.

Esse fato nos levou a pensar que essa banda seria um desdobramento da banda de 64 kDa presente nos géis não redutores. Abaixo dessa banda também foram observadas várias bandas menos intensas e com baixa resolução, possíveis fragmentos da proteína de peso molecular 64 kDa.

Nessas condições também não foram visualizadas as bandas de 48 kDa, 42 kDa, 38 kDa, e 36 kDa. Tais resultados demonstram que essas bandas também correspondem a proteínas que são estabilizadas por pontes de dissulfeto.

Tabela 15 – PM e teores relativos das bandas dos géis mostrados na figura 16.

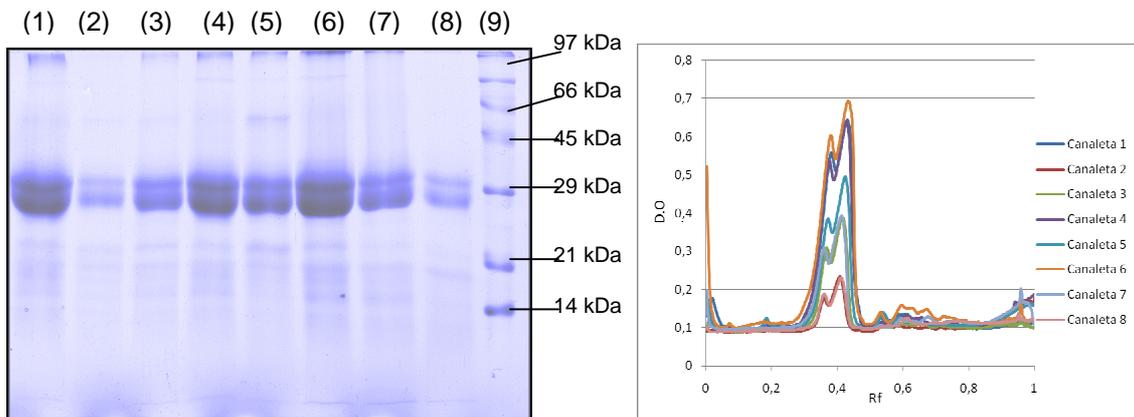
| Produtor | A (L = 8) | | | B (L = 9) | | | C (L = 16) | | |
|----------|-------------|-------------|---|-------------|-------------|---|-------------|-------------|----|
| Banda | PM (kDa) | Teor (%) | n | PM (kDa) | Teor (%) | n | PM (kDa) | Teor (%) | n |
| 1 | 14,1 | 4,3 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 16,6 | 5,1 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 19,5 | 4,4 | 6 | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 21,0 | 7,6 | 8 | 23 | 21,3 | 9 | 22,8 | 6,6 | 16 |
| 5 | 24,4 | 7,0 | 8 | 24,4 | 13,5 | 2 | - | - | - |
| 6 | 29,2 | 47,2 | 8 | 29,4 | 40,7 | 9 | 30,2 | 56,6 | 16 |
| 7 | 32,0 | 27,8 | 8 | 32,8 | 21,8 | 9 | 33,6 | 38,0 | 16 |
| 8 | - | - | - | 51 | 8,4 | 6 | - | - | - |
| 9 | 55,8 | 11,3 | 4 | 54,6 | 11,3 | 7 | 55 | 5,2 | 2 |
| 10 | 98 | 1,6 | 3 | - | - | - | - | - | - |

Na primeira linha é indicado para cada produtor o número de lotes (L) analisados. As bandas foram numeradas em ordem crescente de PM. O teor e o PM para cada banda são as médias dos valores dos diferentes lotes. A coluna n para cada produtor indica em quantos lotes aquela banda foi detectada. O somatório da coluna de Teor não é 100% devido a diferença de frequência na ocorrência dos contaminantes.

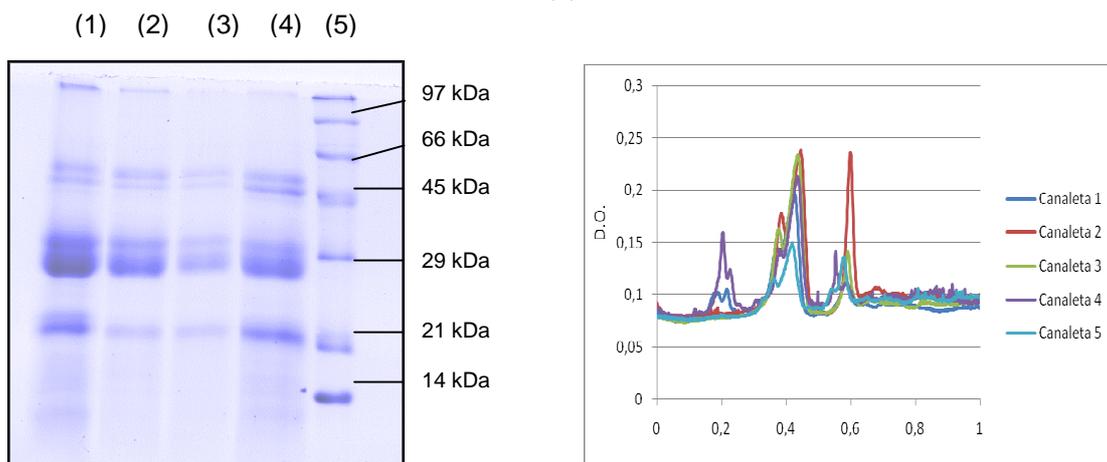
A densitometria das bandas mostrou outros detalhes importantes. Ocorre uma desproporção entre as bandas 6 e 7, que correspondem as cadeias do $F(ab')_2$. Em produtos com uma grande quantidade de IgG essa desproporção pode ser explicada como a incorporação da cadeia leve a banda de 29 kDa. Só que essa desproporção ocorre mesmo em lotes com um teor baixo de IgG.

Uma explicação para esse efeito é que talvez as bandas de 42 kDa, 38 kDa e 36 kDa desdobram-se em proteínas com o peso molecular nessa faixa.

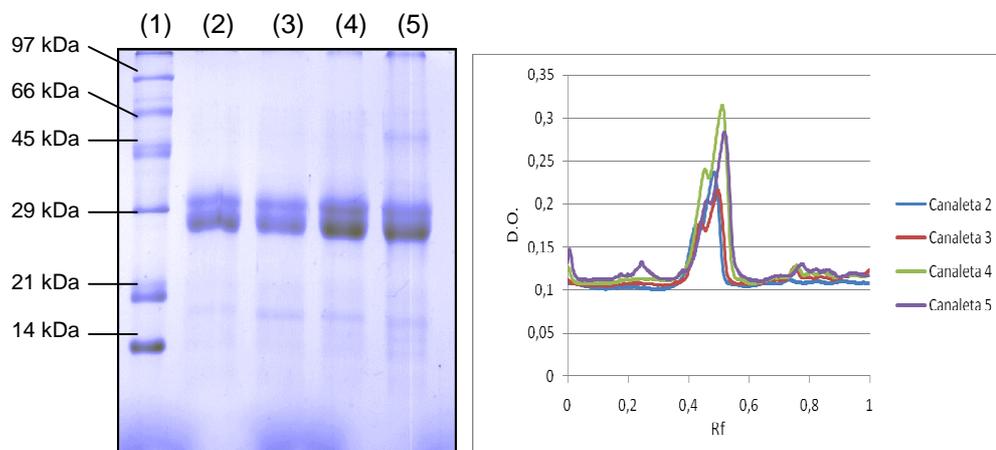
Esses resultados não permitiram a identificação das bandas de forma conclusiva. Para uma caracterização mais definitiva das proteínas presentes, realizamos então os experimentos de imunoblot e eletroforese bidimensional/espectrometria de massas.



(a)



(b)



(c)

Figura 16 Análises de SDS-PAGE (12%) em condições redutoras dos soros antiofídicos nacionais. A esquerda é mostrada a imagem do gel e a direita a análise por densitometria. (a) Gel com as amostras do produtor A. Nas canaletas de (1) até (8) foram aplicados diferentes lotes de soro. Na canaleta (5) foi aplicado o padrão de peso molecular (b) Gel com as amostras do produtor B. Nas canaletas de (1) até (4) foram aplicados diferentes lotes de soro. Na canaleta (5) foi aplicado o padrão de peso molecular. (c). Gel com as amostras do produtor C. Na canaleta (1) foi aplicado o padrão de peso molecular. Nas canaletas de (2) até (5) foram aplicados diferentes lotes de soro.

4.1.4 – Identificação dos Contaminantes

4.1.4.1 – Immunoblot

Para a avaliação por immunoblot, foram utilizadas amostras do produtor B. Seus lotes apresentaram bandas intensas de 150 kDa e 48-42 kDa, que segundo a literatura poderiam ser relacionadas a IgG e aos fragmentos F(ab') e F_c. Foi utilizado anticorpo de coelho contra a IgG eqüina, sem especificidade para isotipo de IgG eqüina ou porção da cadeia.

Como se pode visualizar na figura 17, dependendo do lote, em condições não redutoras, de uma a duas bandas desenvolveram cor. A comparação dos R_f dessas bandas com as bandas identificadas por SDS-PAGE demonstrou que a primeira corresponde à proteína de 145 kDa de PM médio e a segunda à banda de 92 kDa de PM médio. Os dados da comparação estão sumarizados na tabela 16.

A partir desses resultados podemos concluir que apenas a IgG e o F(ab')₂ foram identificados nos soros nacionais, sendo que as bandas de 48-42 kDa a princípio não estão relacionadas ao anticorpo eqüino. Pode-se concluir então que o F_c formado não aparece no produto final, e também não há presença de F(ab'). Esses dois componentes são contaminantes comuns em soros preparados por hidrólise com pepsina (JONES & LANDON, 2002), porém o processo utilizado pelos fabricantes nacionais os remove de forma eficiente.

Outra observação que foi feita a partir do resultado de immunoblot é que o F(ab')₂ é menos reativo que a IgG contra soros policlonais sem especificidade de cadeia (figura 17 e tabela 16). Esse resultado é compatível com dados da literatura (HELMS & ALLEN, 1970), de que os principais determinantes antigênicos da IgG(T) eqüina se encontram na fração F_c, e também com o observado por ELISA, que o F(ab')₂ é muito menos reativo a soros policlonais que IgG (RATANABANANGKOON et al, 1997).

Na tabela 17 é mostrada a comparação como os teores de IgG encontrados nesse trabalho e os teores em soros do Egito, Inglaterra e Estados Unidos.

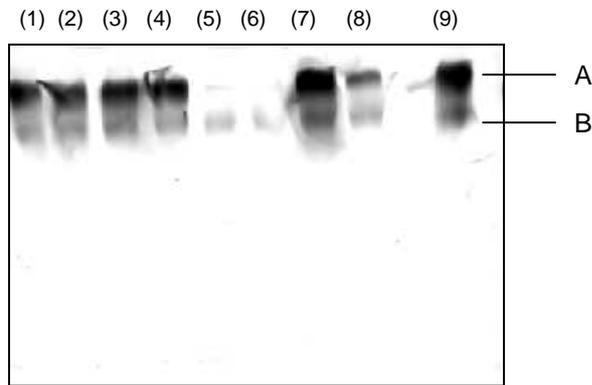


Figura 17: Immunoblot de lotes de SABs em condições não redutoras. Na canaletas de 1 até 9 foram aplicadas amostras dos lotes de soro do produtor (A). O SDS-PAGE foi realizado em condições não redutoras, na concentração de PAGE de 10%. As proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (0,22µm) e reveladas com um anticorpo de coelho anti IgG eqüina conjugado a fosfatase alcalina. O reagente de revelação foi o

Tabela 16: Comparação entre os percentuais de IgG (banda A) e F(ab')₂ (banda B) nos soros antiofídicos, encontrados por SDS-PAGE e immunoblot.

| Canaleta | Banda | PM (kDa) | I (%) | E (%) | Canaleta | Banda | PM (kDa) | % (I) | E (%) |
|----------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|----------|-------|-------|
| 1 | A | 146 | 68,5 | 15 | 5 | B | 85 | 79 | 67 |
| | B | 98 | 31,5 | 51 | | 6 | B | 89 | 79 |
| 2 | A | 135 | 65,1 | 12 | 7 | A | 142 | 65,8 | 13 |
| | B | 88 | 34,9 | 51 | | B | 88 | 34,2 | 49 |
| 3 | A | 135 | 67,2 | 12 | 8 | A | 150 | 56,6 | 13 |
| | B | 88 | 32,8 | 51 | | B | 95 | 43,4 | 56 |
| 4 | A | 136 | 79,7 | 18 | 9 | A | 152 | 72,4 | 14 |
| | B | 89 | 20,3 | 52 | | B | 98 | 27,6 | 48 |

PM expresso em kDa; I (%) é o percentual por Immunoblot; SDS-PAGE é o percentual da banda por SDS-PAGE

Tabela 17: Comparação dos teores relativos de IgG com os dados da literatura.

| Produtor | Teor de IgG | Referência |
|---------------------------|--|----------------------|
| A ⁽¹⁾ | (4 ± 1) % | - |
| B ⁽¹⁾ | (14 ± 2) % | - |
| C ⁽¹⁾ | (7 ± 2) % | - |
| Egito | 6,2 ⁽¹⁾ 7,8 ⁽²⁾ | REDWAN, 2006 |
| MicroPharm ⁽³⁾ | Residual | JONES & LANDON, 2002 |
| Protherics ⁽⁴⁾ | Residual | DART & McNALLY, 2001 |

1 Preparado por precipitação com SA e digestão por pepsina; 2 Preparado por precipitação com AC; 3 Preparado pela hidrólise de IgG de carneiro por pepsina e purificado por cromatografia de troca iônica 4 Preparado pela hidrólise de IgG de carneiro por papaína e purificado por cromatografia de afinidade

4.1.4.2 – Eletroforese Bidimensional

O immunoblot permitiu a identificação das bandas relacionadas a IgG, mas por outro lado outras proteínas não foram identificadas por esse ensaio. Para a identificação dessas proteínas foi feita a eletroforese bidimensional, para que os spots obtidos pudessem ser caracterizados por espectrometria de massa.

As amostras foram preparadas em condições redutoras, para se obter uma maior separação entre as cadeias polipeptídicas. Para uma primeira avaliação sobre o ponto isoelétrico (PI) das proteínas, foi utilizado um strip com gradiente de PI de 3-10. Como havia sido observada, em condições redutoras, a presença de bandas difusas de baixo peso molecular (> 20 kDa), na segunda dimensão foi utilizado um gel na concentração de 15% de acrilamida. As amostras escolhidas para a eletroforese bidimensional foram os soros que apresentaram o maior teor de proteínas totais, de cada um dos produtores.

Os géis obtidos para os três produtores são mostrados na figura 18. Esses géis têm algumas características em comum, assinaladas em quatro regiões nas imagens. A região 1 encontra-se a maior parte das proteínas, com uma faixa restrita de peso molecular e uma grande distribuição de PI (tabela 18). Nessa faixa se encontram os componentes do fragmento $F(ab')_2$, ou seja, a cadeia leve e a fração da cadeia pesada que engloba o V_H , o C_{H1} e parte da região da dobradiça. A dispersão em PI deve-se provavelmente ao V_L e ao V_H , responsáveis pelo reconhecimento do $F(ab')_2$ sobre as toxinas do veneno. Predominam em todos os fabricantes isoformas com PI entre 5,7 e 7,4.

Na região 2 observam-se spots com mesmo peso molecular dos observados no quadro um, porém com PI muito ácido. Uma possibilidade é a presença de pepsina. Essa proteína tem um PI próximo a 2,0 (COOPER et al, 2006), o que poderia explicar os spots em pH muito ácido. O PM observado está abaixo do esperado, porém em condições redutoras as bandas com Rf semelhante ao padrão de pepsina desapareceram, sugerindo a possibilidade de auto-proteólise. Pode-se observar também que essas bandas são mais intensas nos produtores A e C, justamente os que apresentaram um menor teor de IgG.

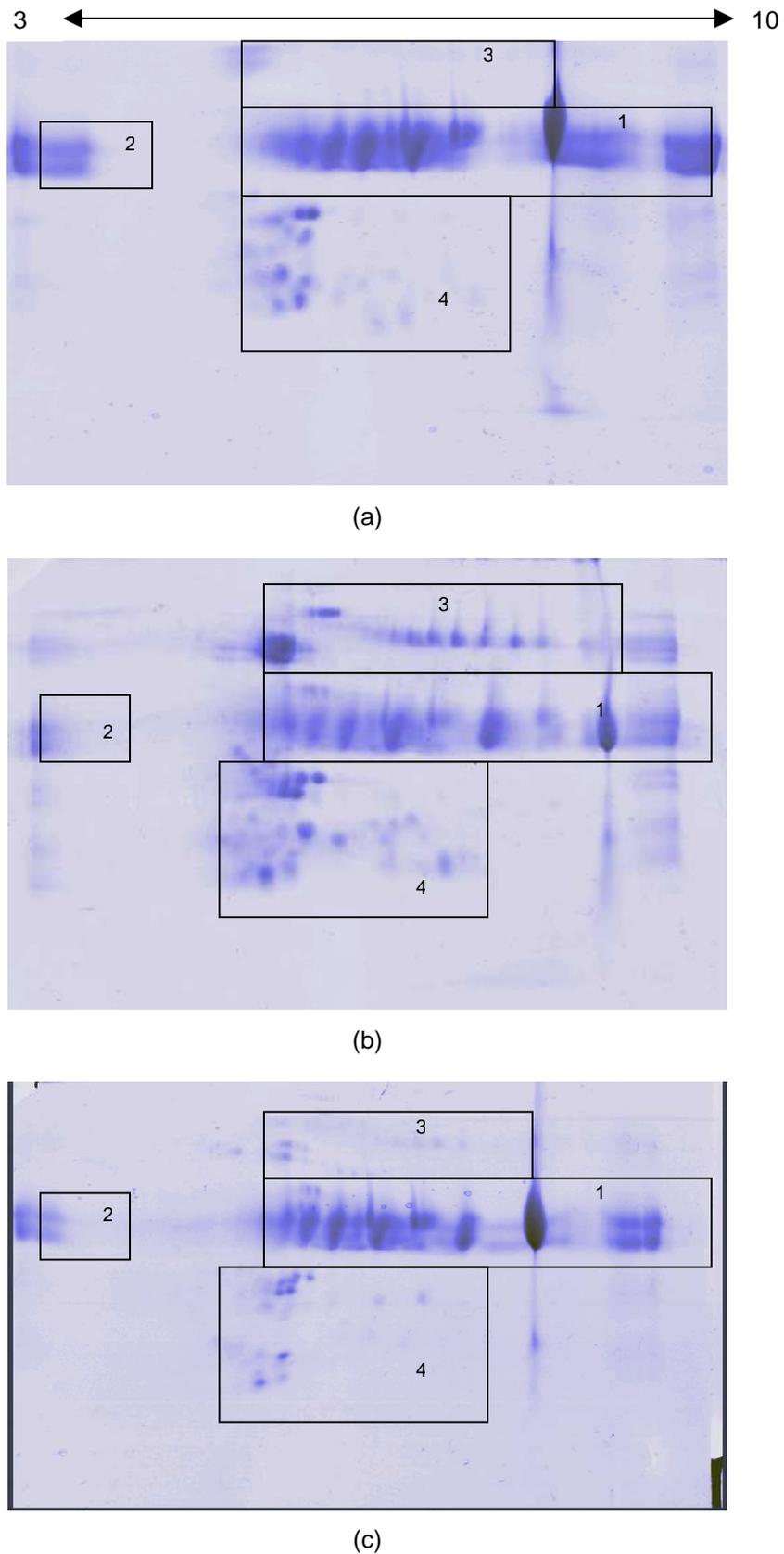


Figura 18: Géis bidimensionais de amostras dos produtores (A), (B) e (C). A primeira dimensão foi realizada com um gradiente de anfólitos com PI de 3 até 10. A segunda dimensão foi realizada com a concentração de 15% de acrilamida. Géis corados com Coomassie R250.

Na região 3 observa-se proteínas com peso molecular maior que as correspondentes ao $F(ab')_2$. Essa região apresenta poucos spots de baixa intensidade nos produtores A e C. No produtor B, ao contrário, há um grande número de spots intensos.

Na região 4 se encontram as proteínas com peso molecular menor que o correspondente ao $F(ab')_2$. Essa região apresenta vários spots com intensidades bastante variadas em todos os produtores. Observa-se que a maior parte desses spots encontra-se em PI ácido, diminuindo em número e intensidade a medida que se caminha para um PI básico. O produtor que apresenta menos bandas nessa parte do gel é C, seguido de A, sendo o maior número de bandas em B. Esses spots serão discutidos mais detalhadamente a seguir.

Para uma melhor avaliação foram determinados PI e peso molecular de todos os spots do gel B (figura 19). Esses valores estão sumarizados na tabela 18. Os pesos moleculares das proteínas correspondentes aos quadros 1 e 2 do gel (spots 13 a 25) são compatíveis com o peso molecular dos componentes do $F(ab')_2$. Ocorre uma tendência nessas bandas a arraste vertical, devido a sua elevada concentração. Esse efeito leva o programa a avaliar o peso molecular com um pequeno aumento. Para diminuir o arraste a técnica recomendada é reduzir a concentração de proteínas. Tentativas de redução da concentração levaram a uma grande redução das proteínas presentes nos quadros três e quatro, de forma que trabalhamos com a quantidade inicial, de 100 μ g de amostra.

No quadro três os spots 4 até 10 tem um peso molecular aproximado ao cadeia pesada da IgG. O efeito de arraste também ocorre, levando novamente a uma avaliação de peso molecular pouco maior que o observado em SDS-PAGE. Os spots 11 e 12 tem um PM compatível com a cadeia pesada, só que se concentram em PI ácido. Possivelmente esses spots correspondem as formas mais glicosiladas da cadeia pesada, que se concentrariam nesse PI devido ao ácido N-glicolil-neuramínico (RAJU et al, 2000).

Os spots de 1 à 3 foram submetidos posteriormente a caracterização por espectroscopia de massas. Na região 4 as bandas mais intensas também foram submetidas a caracterização por espectrometria de massas.

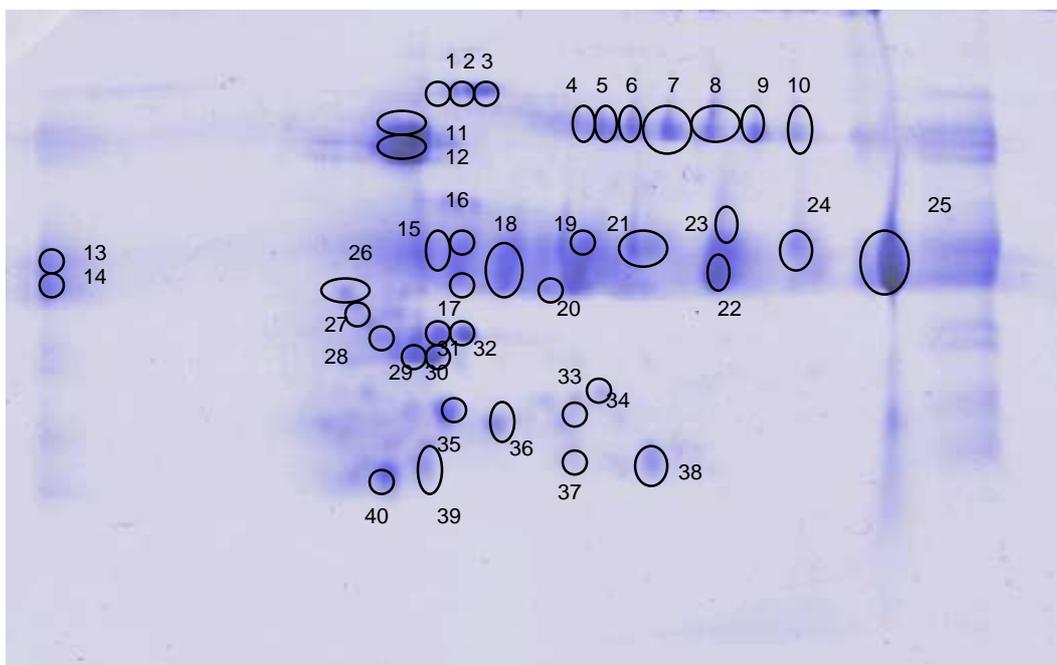


Figura 19: Spots assinalados para a determinação de PI e PM do gel mostrado na figura 18b.

Tabela 18: A PI e PM dos spots do gel B da figura 19. A determinação foi feita utilizando padronização externa.

| Spot | PI (pH) | PM (kDa) | Spot | PI (pH) | PM (kDa) |
|------|---------|----------|------|---------|----------|
| 1 | 5,4 | 66 | 21 | 6,2 | 38,9 |
| 2 | 5,5 | 66 | 22 | 6,5 | 34,5 |
| 3 | 5,6 | 66 | 23 | 6,5 | 39 |
| 4 | 5,9 | 58 | 24 | 6,8 | 39,3 |
| 5 | 6 | 58 | 25 | 7,4 | 34,7 |
| 6 | 6,2 | 58 | 26 | 5,0 | 30,8 |
| 7 | 6,3 | 58 | 27 | 5,1 | 22,8 |
| 8 | 6,5 | 58 | 28 | 5,15 | 20,2 |
| 9 | 6,6 | 58 | 29* | 5,2 | 18,2 |
| 10 | 6,8 | 58 | 30* | 5,25 | 18 |
| 11 | 5,2 | 56,9 | 31* | 5,3 | 20,5 |
| 12 | 5,1 | 52,4 | 32* | 5,5 | 20,5 |
| 13 | - | 36,5 | 33 | 6,0 | 13,6 |
| 14 | - | 32,6 | 34 | 6,1 | 14,6 |
| 15 | 5,2 | 37,5 | 35* | 5,3 | 13 |
| 16 | 6,5 | 34,5 | 36 | 5,6 | 12,2 |
| 17 | 5,4 | 35 | 37 | 5,9 | 10,2 |
| 18 | 5,7 | 37,1 | 38 | 6,2 | 9,9 |
| 19 | 5,9 | 38,2 | 39 | 5,2 | 9,3 |
| 20 | 5,9 | 33,3 | 40* | 5,1 | 9,1 |

Os spots da região 4 comuns aos géis dos três produtores foram assinalados com asterisco. Os spots 13 e 14 não tiveram o valor de PI determinado por estarem fora da escala do padrão.

Para uma melhor comparação entre os géis dos três produtores também foram comparados por sobreposição, utilizando-se função específica do programa PDquest. A comparação leva em consideração a intensidade e o pI/PM de cada spot. O resultados da comparação de intensidade dos spots entre os géis é mostrado nos figuras 20(a), 20(b) e 20(c).

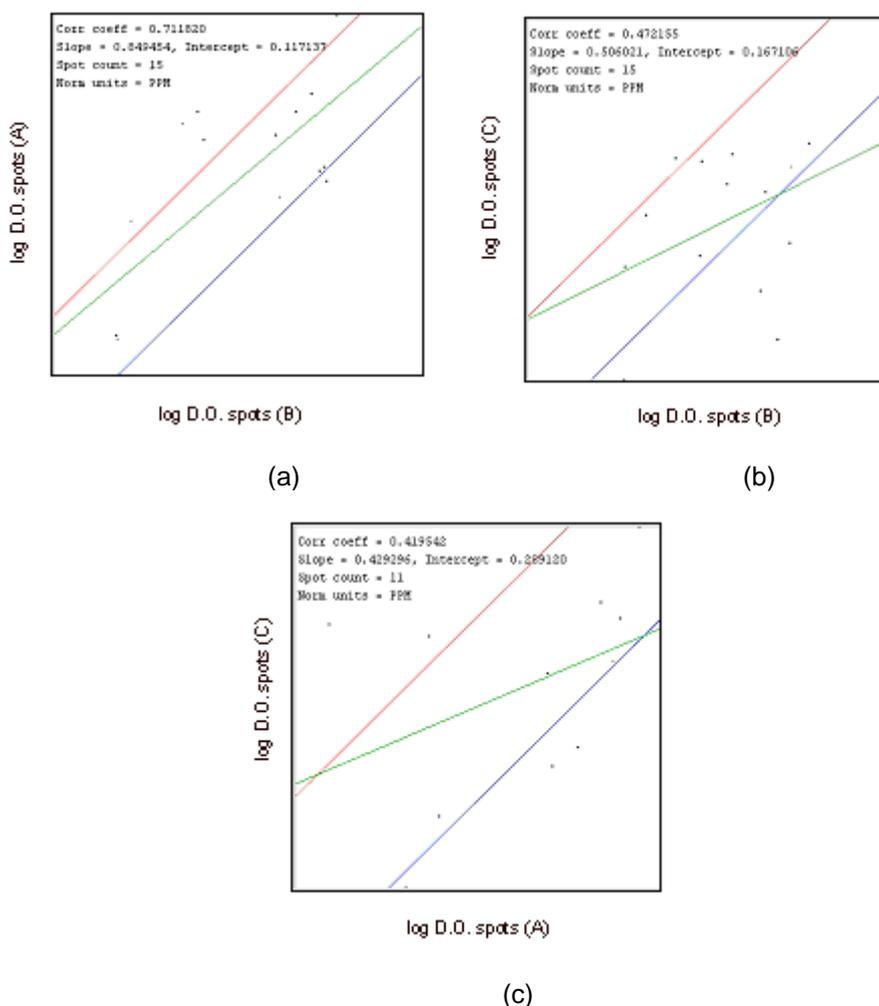


Figura 20: Comparação entre os géis bidimensionais mostrados na figura 18. No eixo horizontal de cada gráfico é lançado o log da intensidade dos spots de um dos géis. No eixo vertical é lançado o log da intensidade dos spots do segundo gel (a) comparação A/C (b) comparação B/C (c) comparação A/C

As comparações entre as intensidades dos spots dos géis geraram valores de coeficiente de correlação, que são tão maiores quanto maior é a semelhança entre os géis. A comparação entre os produtores A/C mostrou a maior semelhança ($r = 0,73$), sendo que as comparações entre A/B (0,47) e B/C (0,43) mostraram um coeficiente baixo. Tais resultados demonstraram que

para esses dois lotes, os processos de purificação dos produtores A e C operaram de forma semelhante.

Utilizando essa função do programa foi possível também assinalar os spots comuns (mesmos PI e PM) a todos os géis. Grande parte dos spots comuns estão presentes nas regiões 1 e 2. Esses spots correspondem a isoformas do $F(ab')_2$ com pI e pM semelhantes, (1) e possivelmente a pepsina (2).

Nos quadros 03 e 04 também ocorrem spots comuns. Os spots 1,2 e 3 foram considerados comuns aos produtores B e C. No quadro 04 foram considerados comuns aos três produtores os spots 29, 30, 31, 32, 35 e 40. A identificação de spots comuns a todos os produtores sugere que os contaminantes são comuns, independente das pequenas diferenças entre os processos de cada fabricante.

4.1.4.3 – Identificação dos Spots

4.1.4.3.1 – Região 3

A primeira característica que chamou a atenção na região 3 da eletroforese bidimensional é um grupo de spots com peso molecular igual e pequena variação de pI, que foram assinalados os spots de 01 até 03. Esses spots podem ser melhor visualizados na figura 21, que corresponde a uma ampliação de cerca de 10 vezes em comparação a figura 19.

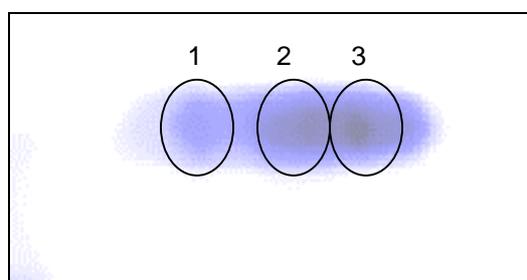


Figura 21: Ampliação de cerca de quatro vezes da região 3 do gel mostrado na figura 18 (b)

A caracterização das proteínas iniciou por esses três spots. Seus espectros de massas foram praticamente idênticos. Os spots 1, 2 e 3 foram identificados como soro albumina de *Equus asinus* (asno). Essa identificação é

bastante coerente com o PI e o PM, encontrados para esses spots, que são semelhantes aos esperados para albuminas (tabela 19).

O que causou surpresa foi a identificação ter sido da proteína de asno. O principal indicativo que os spots correspondem a essa albumina é a presença de um pico com 2298,71 Da. O peptídeo correspondente na albumina do cavalo tem massa de 2285.12 Da (troca de I por V), sendo que pico com essa massa não foi observado no espectro (tabela 20).

Tabela 19: Identificação dos spots 1, 2 e 3 pelo programa MASCOT.

| Característica | PI | PI(e) | PM | PM(e) | Código | CS |
|-----------------------|------|---------|--------|--------|----------------|-----|
| Soro albumina Jumento | 5,89 | 5,4-5,6 | 66 kDa | 66 kDa | AAV28861(NCBI) | 15% |

PI é o ponto isoelétrico encontrado no MASCOT para a proteína; PI(e) é o ponto isoelétrico determinado por eletroforese; PM é o peso molecular encontrado no MASCOT para a proteína; PM(e) é o peso molecular determinado por eletroforese; CS é a cobertura de seqüência alcançada.

Tabela 20: Picos encontrados nos espectros de massas dos spots 1, 2 e 3 que tiveram massa molecular semelhante à de peptídeos da albumina de asno.

| Posição | PM (kDa) | PM (kDa) (e) | variação | Perda | Seqüência |
|---------|----------|--------------|----------|-------|---------------------|
| 161-167 | 912,86 | 912,4705 | 0,3922 | 0 | YLYEVAR |
| 169-185 | 2140,11 | 2139,0101 | 1,1026 | 0 | HPYFYGPPELLFHAEYK |
| 300-309 | 1230,98 | 1231,6053 | -0,6226 | 0 | ACCDKPLLQK |
| 347-359 | 1609,43 | 1608,7824 | 0,6503 | 0 | DVFLGTFLYEYSR |
| 360-371 | 1455,16 | 1454,7994 | 0,3633 | 1 | RHPDYSVSLLLR |
| 508-526 | 2297,70 | 2298,1354 | -0,4327 | 1 | RPCFSALELDEGYIPKEFK |

PM é o peso molecular deduzido a partir da seqüência do peptídeo, pelo MASCOT; PM(e) é o peso molecular encontrado no espectro de massas; A variação refere-se a diferença entre os dois valores; A Perda é o número de ligações peptídicas que não foram hidrolisadas pela tripsina.

Apesar da identificação dessa banda, na maioria dos lotes a banda que suspeitávamos ser ESA desaparecia ou ficava muito menos intensa em condições redutoras. Por esse motivo, foi necessário continuar a caracterização dos demais spots.

4.1.4.3.2 – Região 4

O quadro quatro da eletroforese bidimensional foi o que apresentou o maior número de bandas que não foram associadas ao fragmento $F(ab')_2$. Para uma melhor visualização dessas bandas, esse quadro é mostrado de forma ampliada na figura 22.

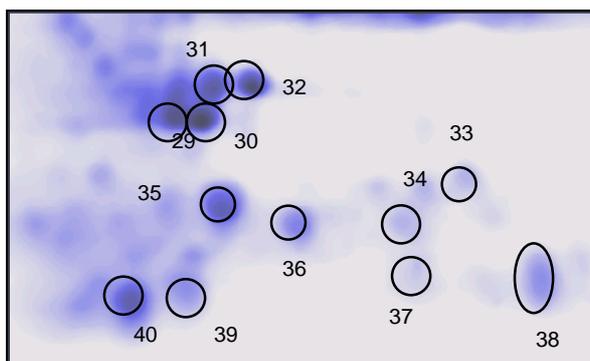


Figura 22: Ampliação de cerca de quatro vezes da região 4 do gel mostrado na figura 18(b)

Dentro desse quadro, foi priorizada a identificação dos spots que se mostraram comuns aos géis dos três produtores. Esses spots foram então submetidos a identificação por espectrometria de massas.

A identificação possibilitou associar os spots presentes a dois tipos principais de sub-produtos do processamento do soro. O primeiro tipo são produtos de proteólise parcial da albumina. O segundo tipo são os produtos de proteólise parcial de imunoglobulinas.

Os spots 29, 30, 31 e 32 tiveram espectros de massas idênticos, e foram identificados utilizando o programa *Protein Prospector* como fragmentos de soro albumina de cavalo. A cobertura de seqüência mostrada na tabela não foi calculada pelo programa, ela foi calculada em relação ao peso molecular da banda.

De forma diferente da identificação dos spots 1, 2 e 3, nos quais os picos do espectro de massas correspondiam a peptídeos distribuídos ao longo da seqüência da albumina de jumento, nesses spots todos os peptídeos se encontravam entre as posições 66 e 232 da seqüência. O PM calculado no expasy para esse trecho da seqüência é de 19,9 kDa, sendo que o PI calculado é de 5,2. Esses valores são muito próximos aos encontrados para os spots 31

e 32, demonstrando mais uma vez a grande probabilidade desse spot corresponder a esse trecho de seqüência.

Tabela 21: Identificação dos spots 29, 30, 31 e 32 pelo programa Protein Prospector

| Proteína | PI | PI(e) | PM | PM(e) | Código | CS |
|-----------------------|------|---------|--------|----------|---------------------|-----|
| Soro albumina Cavalos | 5,89 | 5,3-5,5 | 66 kDa | 20,5 kDa | P35747 (Swiss-Prot) | 55% |

PI é o ponto isoelétrico encontrado no Protein Prospector para a proteína; PI(e) é o ponto isoelétrico determinado por eletroforese; PM é o peso molecular encontrado no Protein Prospector para a proteína; PM(e) é o peso molecular determinado por eletroforese; CS é a cobertura de seqüência alcançada.

Tabela 22: Picos encontrados nos espectros de massas dos spots 29, 30, 31 e 32 com peso molecular semelhante ao de peptídeos da ESA

| Posição | PM (kDa) | PM(e) (kDa) | variação | Perda | Seqüência |
|---------|----------|-------------|----------|-------|------------------------|
| 66-76 | 1277,71 | 1278,71 | -1,00 | 1 | LVNEVTEFAKK |
| 98-105 | 933,52 | 933,58 | -0,06 | 0 | LCTVATLR |
| 118-130 | 1687,79 | 1687,91 | -0,13 | 1 | QEPERNECFLTHK |
| 131-138 | 935,46 | 935,45 | 0,01 | 0 | DDHPNLPK |
| 139-160 | 2504,21 | 2504,50 | -0,29 | 1 | LKPEPDAQCAAFQEDPDKFLGK |
| 161-167 | 913,48 | 913,87 | -0,39 | 0 | YLYEVAR |
| 169-185 | 2140,02 | 2141,12 | -1,10 | 0 | HPYFYGPPELLFHAEYK |
| 223-232 | 1231,52 | 1231,60 | -0,08 | 0 | CSSFQNFGER |

PM é o peso molecular deduzido a partir da seqüência do peptídeo, pelo Protein prospector; PM(e) é o peso molecular encontrado no espectro de massas; A variação refere-se a diferença entre os dois valores; A Perda é o número de ligações peptídicas que não foram hidrolisadas pela tripsina.

Uma observação importante sobre esse espectro é que a maioria dos picos encontrados é de peptídeos comuns a ESA e a albumina de asno. A única exceção é o último pico, que não está presente na albumina do asno. Nessa proteína ocorre a mutação de N₂₂₈ → K₂₂₈ nesse trecho da seqüência. O peptídeo com seqüência [CSSFQKH]⁺ tem massa de 756,33 Da. Pico com essa m/z não foi observado no espectro. O peptídeo resultante de uma perda de uma hidrólise por tripsina [SSFQKGERH]⁺ tem massa de 1245,56 Da e também não foi detectado no espectro. Por esse motivo, associamos esse spot apenas a presença da ESA.

Os resultados da caracterização desses spots também são bastante coerentes com estudos sobre a hidrólise de albumina de carneiro pela pepsina. Nesse estudo foi observado que a hidrólise produzia rapidamente uma banda de 44 kDa, que depois era convertida a uma banda de PM menor que 36 kDa (JONES & LANDON, 2002). Nosso resultado mostrou que um processo de

conversão semelhante deve ocorrer quando a albumina de cavalo é hidrolisada por pepsina, sendo que alguns fragmentos não sofrem proteólise nas condições utilizadas no processo industrial.

O spot 40 foi identificado inicialmente como um fragmento da albumina do cão (*Canis familiaris*) pelo Mascot, conforme mostrado na tabela 23. Esse fragmento tinha um peso molecular muito elevado (30,9 kDa) quando comparado ao valor observado do spot, o que sugere que esse spot é uma parte menor da seqüência da albumina.

Tabela 23: Identificação do spot 40 pelo programa MASCOT

| Proteína | PI | PI (e) | PM | PM (e) | Código | CS |
|-----------------------------------|------|--------|----------|---------|---------------|-----|
| Fragmento da Soro albumina do Cão | 5,51 | 5,1 | 30,9 kDa | 9,1 kDa | I46986 (NCBI) | 13% |

PI é o ponto isoelétrico encontrado no MASCOT para a proteína; PI(e) é o ponto isoelétrico determinado por eletroforese; PM é o peso molecular encontrado no MASCOT para a proteína; PM(e) é o peso molecular determinado por eletroforese; CS é a cobertura de seqüência alcançada.

A comparação dos peptídeos sugeridos com a seqüência da ESA levou a seguinte identificação mostrada na tabela 24. O fragmento da estrutura da ESA entre os resíduos 267-359 tem um peso molecular de 10 kDa e um PI de 5,1, calculados no expasy. Esses valores são bastante compatíveis com os observados no gel bidimensional. Dessa forma podemos concluir que o spot é um trecho da seqüência da ESA que contém esses resíduos.

Tabela 24: Picos encontrados nos espectros de massas do spot 40 com peso molecular semelhante ao de peptídeos da ESA

| Posição | PM (kDa) | PM (kDa) (e) | Varição | Perda | Seqüência |
|---------|----------|--------------|---------|-------|----------------|
| 267-280 | 1749,66 | 1749,67 | -0,01 | 0 | ECCHGDLLECADDR |
| 286-297 | 1436,64 | 1436,70 | -0,06 | 0 | YICEHQDSISGK |
| 347-359 | 1609,79 | 1609,81 | -0,03 | 0 | DVFLGTFLYEYSR |

PM é o peso molecular deduzido a partir da seqüência do peptídeo, pelo MASCOT; PM(e) é o peso molecular encontrado no espectro de massas; A variação refere-se a diferença entre os dois valores; A Perda é o número de ligações peptídicas que não foram hidrolisadas pela tripsina.

Pode-se concluir desses resultados também que a banda de número 08, da tabela 13, é na sua maior parte um produto de proteólise parcial da ESA. Como as demais albuminas, a estrutura terciária da ESA é estabilizada por 17 pontes dissulfeto (CARTER et al, 1993), mostradas na figura 23(a). Nas

condições de hidrólise utilizadas na produção de soros antiofídicos não são empregados redutores. Por esse motivo, produtos de proteólise parcial têm a massa molecular próxima a da proteína inalterada, devido às pontes dissulfeto. O uso de redutores quebra as pontes dissulfeto e forma os fragmentos que foram mais resistentes à hidrólise, nas condições empregadas na produção de soros, conforme mostrado na figura 23(b)

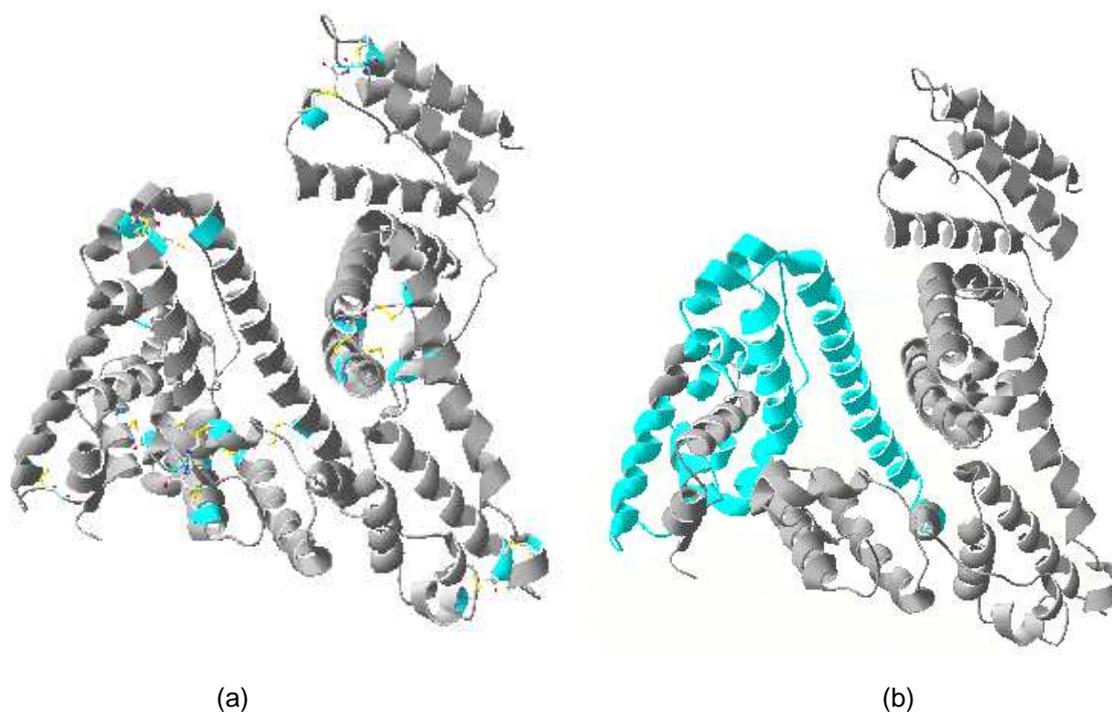


Figura 23: Estrutura tridimensional da ESA. (a) são mostradas em azul as cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto, que estabilizam a estrutura terciária (b) é mostrado em azul o trecho de seqüência que se mostrou resistente a ação da pepsina, nas condições de processamento dos soros antiofídicos.

Tendo a certeza da presença de ESA nas amostras, podemos comparar os valores encontrados nesse trabalho com valores descritos na literatura para o teor residual de ESA encontrado em soros antiofídicos. Essa comparação está resumida na tabela 25.

Devido as características alergênicas da ESA, a resistente a hidrólise encontrada nesse trabalho foi comparada aos epítomos importantes para a ligação de IgE humana a ESA, que já foram parcialmente identificados (DANDEU et al, 1996). Três trechos da seqüência foram associados a essa

capacidade, sendo que dois deles estão em parte no trecho da seqüência que não é hidrolisada por pepsina, conforme mostrado na figura 24.

Tabela 25: Teor de ESA residual nos soros Brasileiros e de produtores de outros países

| Produtor | Teor de ESA (%) | Referência |
|---------------------------|---|-----------------------|
| A ⁽¹⁾ | (12 ±3) | - |
| B ⁽¹⁾ | (12 ± 4) | - |
| C ⁽¹⁾ | (9 ± 3) | - |
| ICP | Residual ⁽²⁾ 4,4 ⁽³⁾ | GUTIERREZ et al,1999 |
| Wyeth ⁽⁴⁾ | 6 | DART & MaCNALLY, 2001 |
| Protherics ⁽⁵⁾ | Residual | |
| Egito | 13,4 ⁽⁶⁾ 4,2 ⁽⁷⁾ | REDWAN, 2006 |

(1) Preparado por precipitação com SA e digestão por pepsina; (2) Preparado por precipitação com AC; (3) Preparado por precipitação com SA; (4) Preparado por precipitação com SA e cromatografia de troca iônica. (5) Animal soro produtor é o carneiro. Preparado por precipitação com sulfato de sódio, hidrólise por papaína e cromatografia de afinidade (ligante veneno). (6) Preparado por precipitação por SA e hidrólise por pepsina. (7) Preparado por precipitação por AC, hidrólise por pepsina

DTHKSEIAHRFNDLGEKHFKGLVLVAFSQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKKCAADESAENC
KSLHTLFGDKLCTVATLRATYGELADCCEKQEPERNECFLTHKDDHPNLPKLKPEPDAQCA
AFQEDPDKFLGKLYEVARRHPYFYGPELLFHAEYKADFTECCPADDKLA CLIPKLDALKE
RILLSSAKERLKCSSFQNGERAVKAWSVARLSQKFPKADFAEVSKIVTDLTKVHKECCHGDL
LECADDRADLAKYICEHQDSISGKLKACCDKPLLQKSHCIAEVKEDDLPSDLPALAADFAED
KEICKHYKDAKDVFLGTFLEYESRRHPDYSVSLLLRIAKTYEATLEKCCA EADPPACYRTVFDQ
 FTPLVEEPPKSLVKKNCDLFEEVGEYDFQNALIVRYTKKAPQVSTPTLVEIGRTLKGKVGSRCKL
 PESERLPCSENHLALALNRLC V LHEKTPVSEKITKCCTDSLAEERRPCFSALELDEGYVPKEFKA
ETFTFHADICTLPEDEKQIKKQSALAEVLVHKPKATKEQLKTVLGNFSAFVAKCCGREDKEACF
 AEEGPKLVASSQLALA

Figura 24: Seqüência da ESA, com os fragmentos formados pela proteólise parcial por pepsina identificados nesse trabalho mostrados em negrito. Os trechos associados ao reconhecimento da ESA por IgE humana (DANDEU et al, 1996) foram sublinhados.

O segundo grupo de spots foi associado a proteólise parcial de IgG. Os spots 33, 34, 35, 36, 37 e 38 foram identificados como porções V_H de imunoglobulinas, utilizando-se o MASCOT. Alguns desses spots apresentaram espectros de massas bastante semelhantes, e por isso foram agrupados. As tabelas com os dados das identificações são mostradas a seguir.

Tabela 26: Identificação dos spots 33, 34, 35, 36, 37 e 38 pelo programa MASCOT

| Spot | Identificação | PI | PI(e) | PM | PM(e) | Código | CS |
|---------|---|------|------------|----------|----------------------|-----------------|-----|
| 33 e 38 | V _H de <i>Camelus dromedarius</i> (Dromedário) | 6,40 | 6,0 6,2 | 12,9 kDa | 13,6 kDa 9,9 kDa | BAD00493 (NCBI) | 40% |
| 34 e 37 | V _H de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho) | 4,6 | 6,1 5,9 | 15 kDa | 14,6 kDa 10,2 kDa | AAC98361 (NCBI) | 38% |
| 35 | V _H de <i>Homo sapiens</i> (homem) | 6,99 | 5,3 | 15 kDa | 13 kDa | AY393015 (NCBI) | 27% |
| 36 | V _H de <i>Mus musculus</i> (rato) | 9,16 | 5,6 | 13 kDa | 12,2 kDa | AAM78256 (NCBI) | 23% |

PI é o ponto isoelétrico encontrado no MASCOT para a proteína; PI(e) é o ponto isoelétrico determinado por eletroforese; PM é o peso molecular encontrado no MASCOT para a proteína; PM(e) é o peso molecular determinado por eletroforese; CS é a cobertura de seqüência alcançada.

Tabela 27: Picos encontrados nos espectros de massas dos hidrolisados tripticos dos spots 33, 34, 35, 36, 37 e 38, que apresentaram semelhança a peptídeos de proteínas identificadas nesses spots.

| Spot | Posição | PM (kDa) | PM(e) (kDa) | variação | Perda | Seqüência |
|---------|---------|-----------|-------------|----------|-------|---------------------|
| 33 e 38 | 1-19 | 1822,9027 | 1822,9900 | -0,0873 | 0 | AVQLVESGGGLVQPGGSLR |
| | 39-57 | 1956,8827 | 1956,9653 | -0,0825 | 1 | QAPGKGLEWVSGINSDGSR |
| | 110-120 | 1081,2127 | 1080,4935 | 0,7193 | 0 | GTQVTVSSESS |
| 34 e 37 | 7-15 | 1081,2127 | 1081,7011 | -0,4884 | 0 | WLLLVAVLR |
| | 90-98 | 979,0527 | 978,4982 | 0,5545 | 0 | TSSTTVDLR |
| | 99-114 | 1822,9027 | 1822,7866 | 0,1162 | 0 | MTSLTAEDTATYFCGR |
| 35 | 35-50 | 1822,9027 | 1823,8777 | -0,9749 | 0 | QAPGQGLEWMGWIHSK |
| | 51-59 | 979,0527 | 979,4610 | -0,4083 | 0 | SGDPNYSLK |
| 36 | 113-124 | 1136,6627 | 1137,5877 | -0,9250 | 0 | GTTVTVSSASTK |
| | 39-50 | 1423,7796 | 1423,5527 | -0,2269 | 1 | QRPGRGLEWIGR |
| | 99-105 | 859,3898 | 859,9927 | 0,6029 | 0 | YCYGIGK |
| | 99-112 | 1661,6966 | 1662,6427 | 0,9461 | 1 | YCYGIGKAMDNWGQ |

PM é o peso molecular deduzido a partir da seqüência do peptídeo, pelo MASCOT; PM(e) é o peso molecular encontrado no espectro de massas; A variação refere-se a diferença entre os dois valores; A Perda é o número de ligações peptídicas que não foram hidrolisadas pela tripsina.

Além da identificação de todos esses spots como fragmentos V_H , a outra característica comum a todos foi o fato de nenhum deles ter sido identificado como de origem eqüina. Tais resultados provavelmente devem-se a dois fatores.

O primeiro é a semelhança existente entre as linhagens germinativas de diferentes espécies de mamíferos (SCHRENZEL et al, 1997; WAGNER et al, 2002). Essa semelhança gerar anticorpos com partes do V_H semelhantes, principalmente nas FR₁-FR₄.

Outro fator relevante é que poucas regiões variáveis de cavalo foram estudadas (ALMAGRO et al, 2006). Outras espécies, como o homem, o coelho e o rato, já tiveram bastantes seqüências V_H elucidadas. O dromedário também teve um grande número de seqüências V_H estudadas, devido a estrutura única de sua imunoglobulina.

4.2 – Preparo de Anticorpos para a Detecção de IgG em Soros Antiofídicos

Na segunda parte desse trabalho foram desenvolvidos anticorpos com especificidade para a determinação da IgG em soros antiofídicos. A disponibilidade desses anticorpos é um pré-requisito para o desenvolvimento de um método imunoquímico rápido.

Existem vários soros comerciais de alta afinidade contra a IgG eqüina. O laboratório Bethyl, por exemplo, fornece inclusive soros contra isotipo específicos. O único inconveniente é que esses soros são policlonais contra a molécula inteira da IgG, não sendo específicos para o F_c . Para a detecção apenas da IgG, sem interferência do $F(ab')_2$, é necessário um soro que detecte exclusivamente a porção F_c .

Não sendo comercialmente disponíveis anticorpos de alta afinidade apenas pela fração F_c eqüina, foi necessário a preparo desse material. Existem duas estratégias principais para a obtenção desse reagente, que serão discutidas a seguir.

A primeira é a obtenção de anticorpos monoclonais. A preparação de anticorpos monoclonais envolve a imunização de um animal com o antígeno de interesse, estimulando a proliferação de linfócitos que secretam anticorpos contra o antígeno. Na segunda fase do processo esses linfócitos são coletados e é feita a fusão dessas células com de células tumorais, gerando o hibridoma, célula com características do linfócito (secreta anticorpos) e de tumor (facilidade de manutenção em cultura) (WINTER & MILSTEIN, 1975).

Para a seleção de anticorpos de alta afinidade os hibridomas formados são diluídos várias vezes em placas para cultivo celular. As diluições feitas da forma adequada levam a cada poço uma célula do hibridoma. Dessa forma em cada poço será secretado um anticorpo diferente. Os anticorpos são então selecionados utilizando métodos como ELISA ou immunoblot, para a determinação dos clones de maior afinidade pelo antígeno.

Embora essa técnica tenha revolucionado a pesquisa biomédica, o processo como um todo é muito laborioso. Para uma garantia de sucesso a imunização do animal deve ser feita com um antígeno de alta pureza. Muitas vezes a obtenção de um antígeno nessas condições pode ser difícil. Um exemplo foi o estabelecimento de monoclonais contra os isotipos de IgGs

eqüinas. Esse estabelecimento requereu separação dos diversos isotipos a partir do plasma de cavalo, o que é muito trabalhoso (HOLMES et al, 1998; SUGIURA et al, 1998).

Atualmente uma alternativa a purificação do antígeno de sua fonte natural é a clonagem e super expressão em um sistema de expressão de proteínas recombinantes, como *Echerichia coli* (BANEYX, 1999) ou *Pichia pastoris* (CREGG & CEREGHINO, 2000). Um exemplo de uso dessa estratégia foi o estabelecimento de monoclonais de alta afinidade para a IgE eqüina. A região constante da cadeia pesada da IgE foi clonada e super expressa em *E. coli*. O material assim preparado foi utilizado para a imunização de camundongos, preparo dos hibridomas e estabelecimento dos monoclonais (WILSON et al, 2006).

Outra etapa trabalhosa é a seleção do monoclonal. Trata-se de um processo de tentativas, que poderá demandar muito tempo. Uma vez determinado um clone de alta afinidade a determinação do epítopo reconhecido pelo anticorpo requer a realização de outros experimentos. Essa determinação é importante, principalmente no desenvolvimento de métodos analíticos, onde a captura deve ser feita por um anticorpo e a revelação por outro anticorpo com afinidade por outro epítopo (PAEK et al, 2000).

A alternativa ao desenvolvimento de monoclonais é a imunização de animais com peptídeos sintéticos. Nesse método peptídeos sintéticos são ligados covalentemente (conjugados) a proteínas imunogênicas. Os conjugados formados são usados na imunização de animais, que produzirão anticorpos contra o peptídeo sintético (MELOEN et al, 2001).

Os soros preparados dessa forma são policlonais com especificidade semelhante a de anticorpos monoclonais (VAN REGENMORTEN, 2001). O soro policlonal pode ser purificado utilizando cromatografia de afinidade, com o peptídeo usado na imunização imobilizado na fase estacionária. Após a purificação o soro apresenta além da especificidade também uma grande sensibilidade.

A grande vantagem é que não há a necessidade de um processo de seleção como é realizado no preparo de monoclonais. Com o conhecimento dos epítomos mais reativos, é possível o planejamento na produção dos antisoros específicos. Outra vantagem desse método é que não é necessário o antígeno protéico, dispensando as etapas de purificação. Por outro lado são

necessárias à síntese dos peptídeos e a conjugação com proteína imunogênica (WISDOM, 1993).

Para o desenvolvimento do teste rápido para a avaliação da presença de IgG eqüina, optamos pela estratégia da imunização com peptídeos sintéticos, que se mostrou mais vantajosa para as nossas condições laboratoriais.

De forma simplificada, para a montagem desse método seria necessária a disponibilidade de dois anticorpos com seletividades contra epítomos presentes no F_c. O primeiro soro seria imobilizado na membrana para a captura do da IgG, sem captura de F(ab')₂. O anticorpo para a revelação do ensaio deve ter seletividade contra o segundo epítomo, de maneira a não ocorrer interferência com a reação de captura.

A segunda escolha é o tipo de animal usado para o preparo dos soros. A escolha natural foram os coelhos, que são animais que podem fornecer um volume de plasma suficiente para o preparo de um grande número de membranas. Além disso, soro de coelhos contra IgG eqüina é comercialmente disponível, inclusive na forma de conjugado com fosfatase alcalina. Esse soro comercial poderia servir de base para o desenvolvimento do trabalho.

A primeira etapa do preparo dos soros foi à escolha dos peptídeos a serem usados na imunização dos coelhos. Para a escolha desses peptídeos realizamos a predição de epítomos dos domínios constantes da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina. A partir dos dados dessa predição, teríamos prováveis epitomos. Os peptídeos correspondentes a esses epítomos poderiam ser utilizados no preparo de conjugados para a obtenção dos anticorpos com reatividade específica.

4.2.1 – Predição de Epítomos da Cadeia Pesada de IgG Equina

A predição de epítomos é um conjunto de técnicas que utiliza programas de computador para avaliar numa estrutura de proteína as prováveis regiões que serão reconhecidas como antigênicas (PONOMARENKO & BOURNE, 2007). A predição apenas indica bons candidatos a epítomos, sendo que a confirmação desses candidatos deve ser feita por uma técnica experimental, num processo conhecido como mapeamento de epítomos (TRIBBICK, 2002; HAGER-BRAUN, 2005).

As técnicas de predição de epítomos são muito importantes atualmente. O uso de técnicas experimentais para avaliar o grande número de antígenos presentes nesses organismos demandaria um grande gasto de material e tempo (FLOWER & DAVIES, 2007). Por esse motivo, vários programas foram desenvolvidos nos últimos anos com essa finalidade (GREENBAUM et al, 2006). Esses programas levam em consideração os dois arranjos espaciais que epítomos podem apresentar para a realização da predição.

O primeiro arranjo espacial são os epítomos contínuos, ou seja, epítomos formados por aminoácidos próximos na estrutura primária. Um exemplo desse caso é mostrado na Figura 25a. O segundo arranjo são os epítomos descontínuos, formados por aminoácidos que se encontram em posições distantes na estrutura primária. Epítomos descontínuos dependem da estrutura tridimensional da proteína para que ocorra o reconhecimento pelo anticorpo. Um exemplo de epítopo descontínuo é mostrado na Figura 25c.

Há na literatura científica um consenso de que os métodos de predição de epítomos contínuos são mais precisos que os métodos para a predição de epítomos conformacionais (LUND et al, 2006b)

Por esse motivo, iniciamos a predição de epítomos na imunoglobulina eqüina utilizando programas que se baseiam apenas na estrutura primária, para a determinação de epítomos contínuos. A esses programas foi submetida a seqüência do isotipo 3 (Figura 26), por ser o mais abundante nos soros antiofídicos nacionais.

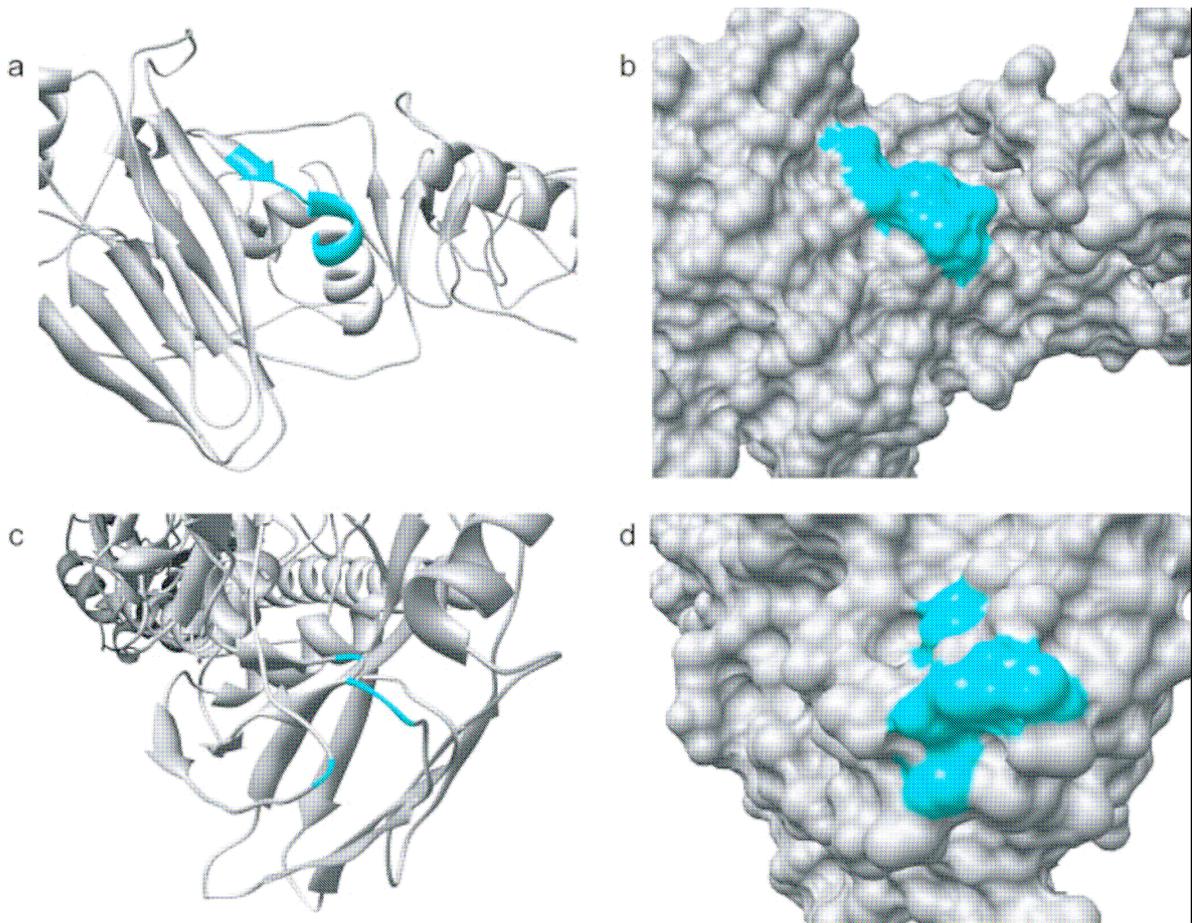


Figura 25: Exemplos dos arranjos espaciais de epítomos em proteínas. (a) Vista de um epítomo contínuo na estrutura da hemaglutinina do vírus influenza A (b) Vista do mesmo epítomo na superfície da proteína (c) Um epítomo descontínuo na mesma proteína (d) Vista do epítomo descontínuo na superfície da proteína (GREENBAUM, 2006).

```

ASTTAPKVFPLAPSCGTTSDSTVALGCLVSSYFPEPVTVSWNSGTLTSGVRTFPSVLQSSGLY
SLSSMVTVPASSLESKTYICNVAHPASSTKVDKRIEVLPKPTTPAPTVPPLTTTVPVETTTTPCP
CECPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLMITRTPEVTCLVVDVSHDSSDLFTWYVDGTEVKTA
KTMPEEQNNSTYR VVSVLRIQHQDWLNGKFKCKVNNQALPAPVERTISKATGQTRVPQVY
VLAPHPDELSKNKVSVTCLVKDFLPTDITVEWQSNEHPEPEGKYRTTEAQKDSGSGYFLYSKLT
VETDRWQQGTTFTCVVMHEALHNHVMQKNVSHSPGK

```

Figura 26: Seqüência do isotipo IgG3 eqüino.

4.2.1.1 – Predição a partir da Estrutura Primária

4.2.1.1.1 – Predição pela Escala de Jameson Wolf

A primeira escala de predição utilizada foi a de Jameson e Wolf, que é uma das escalas de predição mais tradicionais (PELLEQUER et al, 1993). Essa escala determinou 15 picos de antigenicidade, que são demonstrados na Figura 27 e na Tabela 28.

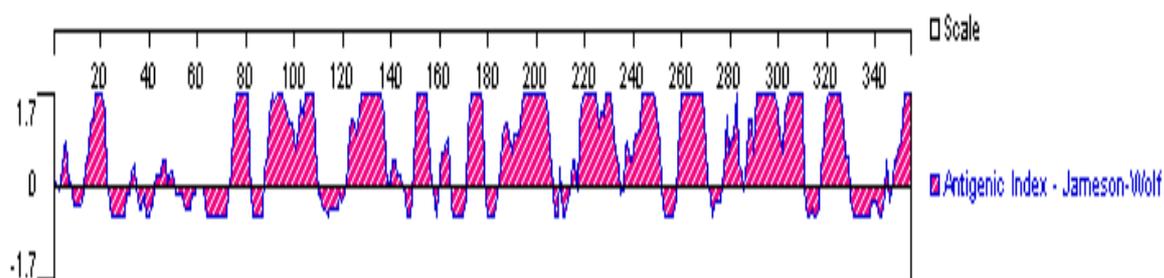


Figura 27: Distribuição dos resíduos antigênicos do isotipo IgG3 pela escala de Jameson-Wolf

Tabela 28: Epítomos previstos para o isotipo IgG3, pela escala de Jameson-Wolf

| S | I | T | Seqüência | N |
|----|-----|-----|---------------|----|
| 1 | 18 | 22 | TTSDST | 6 |
| 2 | 76 | 81 | SLESKTY | 7 |
| 3 | 91 | 96 | ASTKVD | 6 |
| 4 | 103 | 107 | PKPTT | 5 |
| 5 | 128 | 136 | ETTTPPCPCECPK | 13 |
| 6 | 150 | 155 | PKPKV | 5 |
| 7 | 173 | 178 | SHDSS | 5 |
| 8 | 195 | 204 | TMPNEEQNNST | 11 |
| 9 | 219 | 230 | LNGKKFKCKVNN | 12 |
| 10 | 243 | 248 | TISKATGQTRVP | 12 |
| 11 | 259 | 268 | HPDELSKNKV | 10 |
| 12 | 290 | 298 | EHPEPEGKY | 9 |
| 13 | 303 | 309 | AKQSDSG | 7 |
| 14 | 320 | 325 | ETDRWQ | 6 |
| 15 | 351 | 354 | SPGK | 4 |

S é o número da seqüência; I é a posição do aminoácido inicial; T é a posição do aminoácido terminal. N é o número de aminoácidos na seqüência.

4.2.1.1.2 – Predição pela Escala de Kolaskar

A escala de Kolaskar (KOLASKAR & TONGAONKAR, 1990) produziu 13 picos de antigenicidade, conforme pode ser visualizado na Figura 28 e na Tabela 29.

Os resultados dessa escala mostraram seqüências mais extensas que utilizando a escala de Jameson Wolf. As seqüências 3 e 6 poderiam conter facilmente mais de um epítipo diferente, devido a sua extensão, incompatível com epítipos lineares típicos tem apenas de 6 até 10 aminoácidos (VAN REGENMORTEL, 2001).

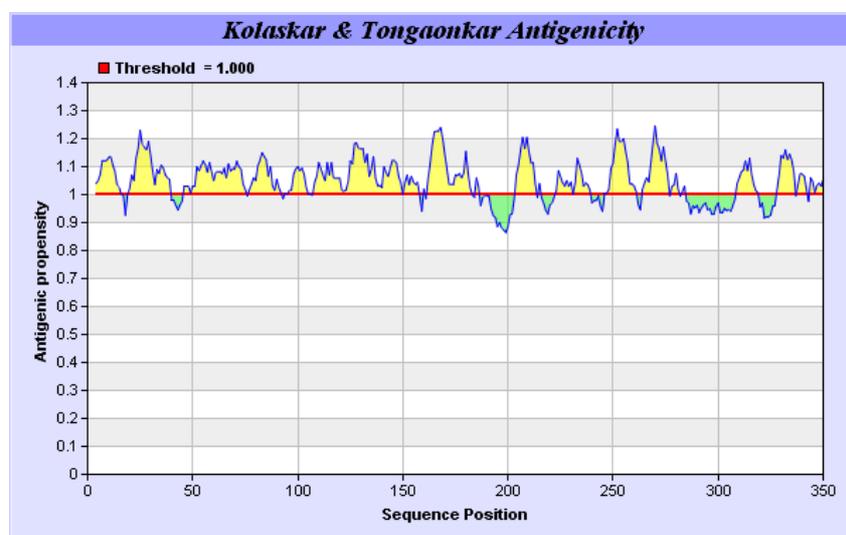


Figura 28: Distribuição de resíduos antigênicos no isotipo IgG3 pela escala de Kolaskar.

Tabela 29: Epítipos presentes no isotipo da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina, pela escala de Kolaskar.

| S | I | T | Seqüência | N |
|----|-----|-----|--|----|
| 1 | 4 | 15 | APKVFPLAPSCG | 12 |
| 2 | 19 | 39 | DSTVALGCLVSSYFPEPVTVS | 21 |
| 3 | 46 | 75 | TSGVRTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPASSL | 30 |
| 4 | 77 | 92 | SKTYICNVAHPASSTK | 16 |
| 5 | 96 | 106 | RIEPLPKPTT | 11 |
| 6 | 108 | 157 | APTVP LTTTVPVETTTTPPCPECPKCPAPPELLGGPSVFIFPPKPKDVLMI | 50 |
| 7 | 162 | 182 | EVTCLVVDVSHDSSDVLFTWY | 21 |
| 8 | 204 | 213 | YRVVSVLRIQ | 10 |
| 9 | 223 | 239 | FKCKVNNQALPAPVERT | 17 |
| 10 | 246 | 261 | QTRVPQVYVLAHPDE | 16 |
| 11 | 264 | 276 | KNKVSVTCLVKDF | 13 |
| 12 | 309 | 319 | SYFLYSKLTVE | 11 |
| 13 | 328 | 336 | TFTCVVMHE | 9 |

S é o número da seqüência; I é a posição do aminoácido inicial; T é a posição do aminoácido terminal. N é o número de aminoácidos na seqüência.

4.2.1.1.3 – Predição pela Escala Bepipred

A última escala utilizada foi a Bepipred, mais recentemente criada (LUND et al, 2006a). Essa escala encontrou 16 picos de antigenicidade, mostrados na Figura 29 e na Tabela 30.

A avaliação dos resultados mostrou que essa escala encontrou trechos muito longos, como as seqüências 7 e 14, que podem conter mais de um epítopo. Também foram sugeridas seqüências muito curtas, como a 4, 11 e 15, que não podem formar epítomos.

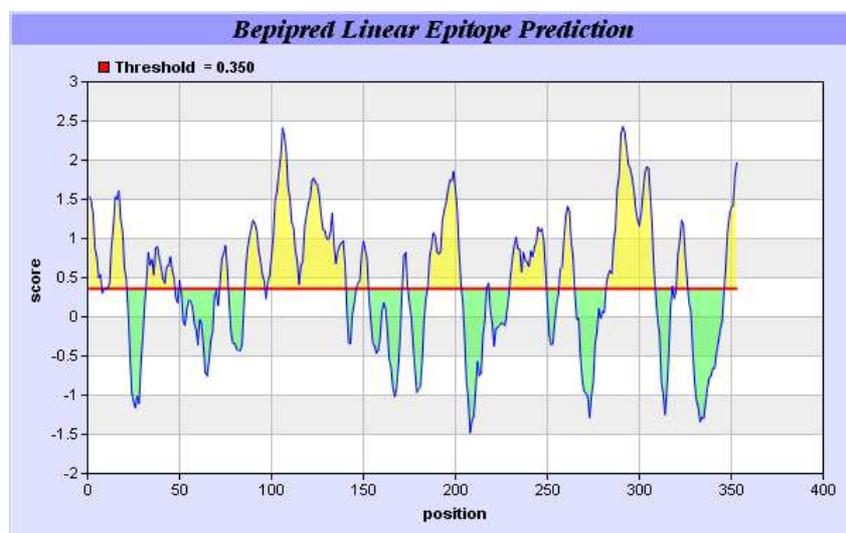


Figura 29: Distribuição de resíduos antigênicos no isotipo do isotipo IgG3 pela escala bepipred.

Tabela 30: Epítomos presentes no isotipo da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina, pela escala Bepipred.

| S | I | T | Seqüência | N |
|----|-----|-----|---|----|
| 1 | 1 | 7 | ASTTAPKV | 7 |
| 2 | 9 | 21 | PLAPSCGTTSDST | 13 |
| 3 | 32 | 47 | FPEPVTVSWNSGTLTS | 16 |
| 4 | 50 | 50 | R | 1 |
| 5 | 72 | 76 | ASSLE | 5 |
| 6 | 86 | 96 | HPASSTKVDKR | 11 |
| 7 | 98 | 140 | EPVLPKPTTPAPTVPPLTTTVPVETTTPPCPCECPKCPAPPELLG | 43 |
| 8 | 146 | 152 | IFPPKPK | 7 |
| 9 | 171 | 174 | SHDS | 4 |
| 10 | 185 | 203 | GTEVKTAKTMPNEEQNNST | 19 |
| 11 | 217 | 218 | WL | 2 |
| 12 | 230 | 249 | QALPAPVERTISKATGQTRV | 20 |
| 13 | 257 | 264 | PHPDELSK | 8 |
| 14 | 282 | 308 | TVEWQSNEHPEPEGKYRTTEAQKDSGD | 27 |
| 15 | 318 | 318 | V | 1 |
| 16 | 321 | 326 | DRWQQG | 6 |

S é o número da seqüência; I é a posição do aminoácido inicial; T é a posição do aminoácido terminal. N é o número de aminoácidos na seqüência.

4.2.1.1.4 – Comparação de Predições Baseadas na Estrutura Primária

Avaliando-se os resultados das três escalas de predição, pode-se observar algumas divergências. Essas divergências eram de certa forma esperadas, pois cada escala utiliza uma sistemática diferente para a predição de epítomos.

Como epítomos de maior probabilidade, consideramos as seqüências que foram determinadas por pelo menos dois métodos diferentes. 16 seqüências, mostradas na Tabela 31, foram comuns a pelo menos dois métodos diferentes.

Tabela 31: Consolidação dos resultados da predição de epítomos a partir da seqüência primária da IgG3.

| S | I | T | Seqüência | N |
|----|-----|-----|--|----|
| 1 | 2 | 7 | STTAPK | 7 |
| 2 | 15 | 22 | CGTTSDST | 8 |
| 3 | 32 | 47 | FPEPVTVSWNSGTLT | 16 |
| 4 | 75 | 81 | SLESKTY | 7 |
| 5 | 88 | 96 | ASSTKVDK | 8 |
| 6 | 103 | 137 | PKPTTPAPTVPPLTTTVPVETTTTPPCPCCEPKCPAPE | 35 |
| 7 | 150 | 152 | PKP | 3 |
| 8 | 162 | 165 | PEVT | 4 |
| 9 | 171 | 174 | VSHD | 4 |
| 10 | 185 | 203 | DGTEVKTAKTMPNEEQNNS | 19 |
| 11 | 212 | 213 | RI | 2 |
| 12 | 217 | 218 | DW | 2 |
| 13 | 246 | 249 | QTR | 3 |
| 14 | 259 | 264 | HPDELS | 6 |
| 15 | 290 | 298 | EHPEPEGKY | 9 |
| 16 | 318 | 326 | TVETDRWQQ | 9 |

S é o número da seqüência; I é a posição do aminoácido inicial; T é a posição do aminoácido terminal. N é o número de aminoácidos na seqüência.

Apesar de termos quinze prováveis epítomos para iniciar o preparo de peptídeos sintéticos para a imunização de coelhos, resolvemos fazer alguns refinamentos desses resultados. Esses refinamentos se basearam em duas características da IgG que os programas de predição a partir da estrutura primária não consideram.

A primeira característica é o fato que o coelho também produz a IgG, ou seja, para esses animais a IgG não é um antígeno típico.

A segunda característica é o fato da IgG ser uma molécula tetramérica. Dessa forma, algumas seqüências que os programas que fazem predições a partir da estrutura primária consideram acessíveis podem na verdade se encontrar em regiões de interface entre as cadeias, não sendo acessíveis.

4.2.1.2 – Alinhamento das Seqüências das Cadeias Pesadas Equínas com a Seqüência da Cadeia Pesada do Coelho

Uma seqüência deve ser reconhecida como *estranha* pelo hospedeiro, para que ela contenha epítomos (VAN REGENMORTEL, 1998). Entre espécies muito diferentes, como mamíferos e microrganismos, é comum o animal a ser imunizado não ter proteínas se quer semelhantes as do agente infeccioso, caracterizando seqüência efetivamente estranha, tornando dispensável uma comparação entre as seqüências.

No caso de predição dos epítomos na imunoglobulina eqüina, deve-se levar em consideração que o coelho também tem imunoglobulinas. Logo, as seqüências que foram preditas anteriormente só serão efetivamente imunogênicas no coelho se elas não estiverem presentes na região constante da cadeia pesada da IgG desse animal.

Um grande facilitador nesse caso é o fato que o coelho só tem um isotipo de cadeia pesada (KNIGHT et al, 1985). Assim, foram alinhadas a região constante da cadeia pesada do coelho com os seis principais isotipos da cadeia pesada do cavalo. Apesar de estarmos trabalhando com o isotipo 3, é importante também verificar se os demais isotipos tem o mesmos epítomos previstos em IgG3.

O alinhamento completo é mostrado na Figura 30, sendo que a similaridade entre as seqüências de todos os isotipos e a cadeia do coelho foi de 70%. As maiores diferenças encontram-se na região da dobradiça, que no isotipo IgG3 é mais extensa que no coelho e nos demais isotipos eqüinos.

A primeira avaliação do alinhamento nos levou a descartar os peptídeos 3, 5, 7, 8, e 12 da Tabela 38. As seqüências desses peptídeos são idênticas nos dois animais, não possibilitando a antigenicidade no coelho.

Continuando com a avaliação, os peptídeos 9, 11 e 13 da Tabela apresentam diferenças de apenas um aminoácido entre as duas espécies. Por esse motivo consideramos esses peptídeos como provavelmente pouco antigênicos.

As demais seqüências são bastante diferentes entre as duas espécies, caracterizando prováveis bons epítomos. Na Tabela 32 são listados os prováveis epítomos, excluindo-se as seqüências idênticas observadas no alinhamento.

4.2.1.3 – Modelagem por Homologia do Isotipo IgG3

Os métodos de predição baseados em estrutura primária consideram a proteína como uma única cadeia, o que não é o caso das imunoglobulinas, que são tetrâmeros. Mesmo que uma porção da estrutura da cadeia pesada apresente boas características que possam torná-la antigênica, essa região da molécula poderá se situar em uma interface com a outra cadeia pesada (C_{H3}) ou com a cadeia leve (C_{H1}). As regiões de interface não são expostas ao solvente, não apresentando, portanto um bom potencial antigênico.

Além das interfaces entre as cadeias, a modelagem molecular fornece uma informação mais precisa sobre a acessibilidade dos resíduos, contribuindo para esclarecer melhor os prováveis epítomos.

Para visualizar as regiões de interface na estrutura da cadeia pesada de cavalo, foi feita a modelagem por homologia da cadeia pesada do isotipo IgG3. Não há resultados de cristalografia de raios-X de imunoglobulina de cavalo disponível em bancos de estruturas, então a modelagem foi feita utilizando-se um modelo de imunoglobulina humana disponível no PDB, que apresentou maior identidade com a IgG3 eqüina.

O alinhamento utilizado para a modelagem é mostrado na Figura 31. Esse alinhamento apresentou algumas características importantes para a qualidade do modelo formado. A semelhança entre as proteínas é elevada, como uma identidade de 64% e similaridades em 9%. As inserções/deleções correspondem a 6% das seqüências alinhadas, principalmente na região da dobradiça.

Outro indicativo importante da qualidade do alinhamento é a coincidência entre os resíduos de cisteína da proteína molde com os resíduos de cisteína da IgG3. Essa coincidência é relevante, devido a importância desse aminoácido para estabilização da estrutura tridimensional.

A avaliação do modelo formado pelo gráfico de Ramachandran (Figura 31) foi bastante satisfatória. A maioria dos resíduos se encontra em regiões mais prováveis (90,1%) e favoráveis (9,3%) do gráfico. Apenas a S_{288} se encontrou em uma região proibida do gráfico. Esse resíduo se encontra em uma região em que ocorre uma inserção/deleção entre as duas seqüências, como pode ser visto no alinhamento (Figura 32). Essa ocorrência explica essa pequena deficiência do modelo.

| | | | | | | |
|---------|-----|---------------|---------------|--------------|-------------|----------------|
| 1hzhH | 1 | QVQLVQSGAE | VKKPGASVKV | SCQASGRFSS | NFVIHWVRQA | PGQRFEWMGW |
| 1hzhH | 51 | INPYNGNKEF | SAKFQDRVTF | TADTSANTAY | MELRSLRSAD | TAVYYCARVG |
| 1hzhH | 97 | PYSWDDSPQD | NYYMDVWGKG | TTIVIVSSAST | KGPSVFPLAP | SSKSTSGGTA |
| Model_1 | 1 | | | AST | TAPKVFPLAP | SCGTTSDSTV |
| | | | | *** | . * ***** | * . ** . * |
| 1hzhH | 139 | ALGCLLVKDYF | PEPVTVSWNS | GALTSGVHTF | PAVLQSSGLY | SLSSVTVTPS |
| Model_1 | 24 | ALGCLLVSSYF | PEPVTVSWNS | GTLTSGVRTF | PSVLQSSGLY | SLSSMVTVPA |
| | | ***** ** | ***** ** | * ***** ** | * ***** ** | ***** ** |
| 1hzhH | 196 | SSLGTQTYIC | NVNHKPSNTK | VDKKAEPKSC | DKTHT----- | ----- |
| Model_1 | 74 | SSLESKTYIC | NVAHPASSTK | VDKRIEPLVP | KPTTPAPTVP | LTTTVPVETT |
| | | *** . *** | ** * * * * | *** . ** | * * * | * |
| 1hzhH | 239 | -----CPP | CPAPELLGGP | SVFLFPPKPK | DTLMISRTPE | VTCVWVDVSH |
| Model_1 | 124 | TPPCPCCEPK | CPAPELLGGP | SVFIFPPKPK | DVLMITRTPE | VTCLVVDVSH |
| | | ** | ***** ** | *** ***** | * ** * | *** ***** |
| 1hzhH | 282 | EDPEVKFNWY | VDGVEVHNAK | TKPREEQYNS | TYRVVSVLTV | LHQDWLNGKE |
| Model_1 | 174 | DSSDVLFTWY | VDGTEVKTAK | TMPNEEQNNS | TYRVVSVLRI | QHQDWLNGKK |
| | | . . . * * * * | *** ** * * | * * * * * * | * * * * * * | ***** . ***** |
| 1hzhH | 338 | YKCKVSNKAL | PAPIEKTISK | AKGQPREPOV | YTLPPSRDEL | TKNQVSLTCL |
| Model_1 | 224 | FKCKVNNQAL | PAPVERTISK | ATGQTRVPOV | YVLAPHPDEL | SKNKVSVTCL |
| | | ***** * ** | *** * ***** | * * * * * * | * * * * * | *** * ** ***** |
| 1hzhH | 392 | VKGFYPSDIA | VEWES--NGQ | PENNYKTPPP | VLDSGDSFFL | YSKLTVDKSR |
| Model_1 | 274 | VKDFLPTDIT | VEWQSNEHPE | PEGKYRTTEA | QKDSGDSYFL | YSKLTVETDR |
| | | ** * * * * * | *** * * . . . | ** * * * * | ***** ** | ***** . * |
| 1hzhH | 448 | WQQGNVFSCS | VMHEALHNHY | TQKSLSLSPG | K-- | |
| Model_1 | 324 | WQQTTFITCV | VMHEALHNHV | MQKNVSHSPG | K- | |
| | | ***** * * * | ***** ** | ** . * * * * | ** | |

Figura 31: Alinhamento usado na modelagem molecular da cadeia pesada da IgG3 eqüina.

Como o principal objetivo dessa modelagem era avaliar a acessibilidade dos resíduos, não foi feito nenhum refinamento para a melhoria da estrutura da S₂₈₈. Com exceção desse resíduo, o modelo apresentou uma boa qualidade, o que tornou possível avaliar algumas características importantes para o caráter antigênico da IgG3 eqüina, principalmente os resíduos mais expostos ao solvente.

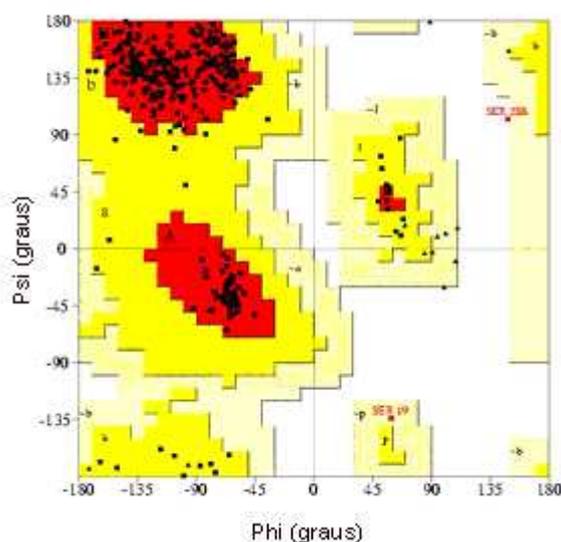
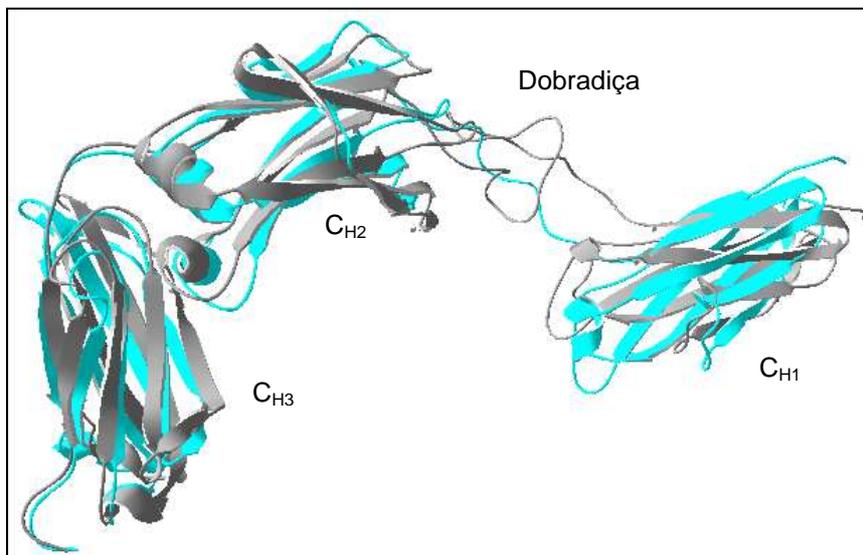
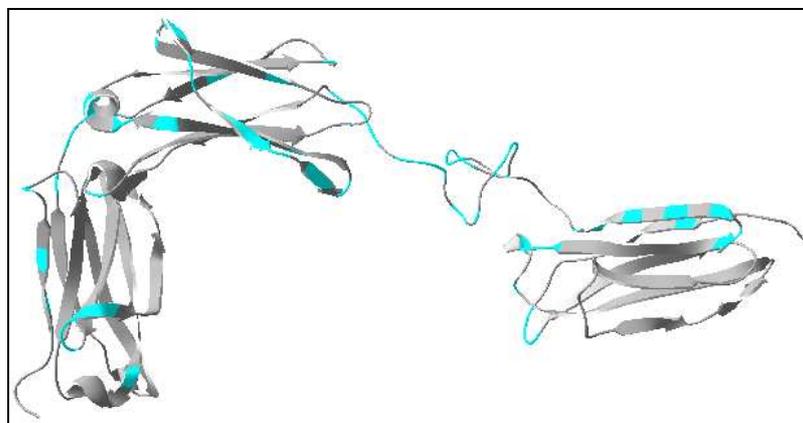


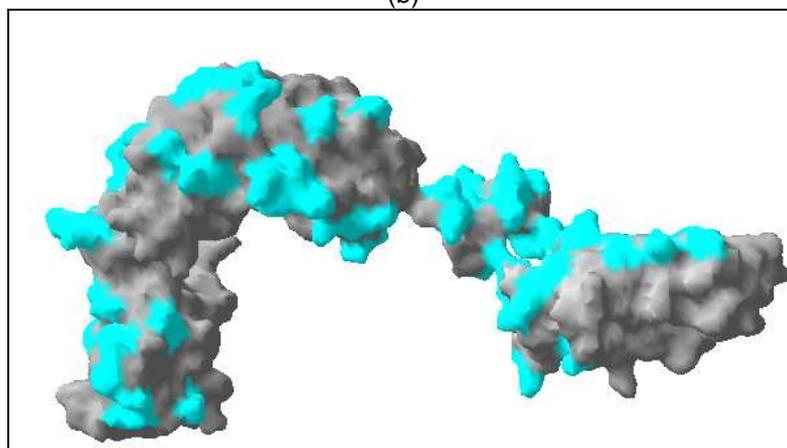
Figura 32: Gráfico de Ramachandran dos resíduos do modelo gerado para a IgG3 eqüina



(a)



(b)



(c)

Figura 33: Modelo da estrutura tridimensional da cadeia pesada do isotipo IgG3 da imunoglobulina eqüina. (a) Sobreposição entre a estrutura da imunoglobulina humana anti-HIV (código pdb 1hzh em azul) e o modelo gerado da cadeia pesada da IgG3 eqüina (cinza)(b) modelo da IgG3 gerado. São marcados em azul os aminoácidos com mais de 30% de exposição ao solvente, que não são comuns à cadeia pesada do coelho (c) Vista da superfície dos aminoácidos com mais de 30% de exposição ao solvente.

Foram assinalados os resíduos com pelos menos 30% da superfície exposta ao solvente, que tem maior tendência a formação de epítopos (KOLASKAR & KULKARNI-KALE, 1999). Um total de 132 resíduos apresentou essa propriedade. Desse grupo foram excluídos os resíduos que segundo a proteína molde estariam em interfaces de cadeia e os resíduos que segundo o alinhamento da Figura 30 são idênticos entre o coelho e o cavalo. Esses resíduos são mostrados na estrutura do modelo gerado, nas Figuras 33(b) e 33(c).

Os resultados da modelagem foram então comparados à predição a partir da estrutura primária. No total seis dos 16 epítopos originais foram excluídos da predição, levando ao resultado mostrado na Tabela 32.

Tabela 32: Consolidação dos resultados da predição de epítopos da seqüência IgG3.

| S | I | T | Seqüência | N |
|---|-----|-----|---|----|
| 1 | 2 | 7 | <u>S</u> T <u>T</u> A <u>P</u> K | 6 |
| 2 | 15 | 22 | C <u>G</u> T <u>T</u> S <u>D</u> S <u>T</u> | 8 |
| 3 | 75 | 81 | S <u>L</u> E <u>S</u> K <u>T</u> Y | 7 |
| 4 | 103 | 137 | <u>P</u> K <u>P</u> T <u>T</u> <u>P</u> A <u>P</u> T <u>V</u> <u>P</u> L <u>T</u> T <u>I</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>E</u> T <u>T</u> T <u>P</u> <u>P</u> C <u>P</u> C <u>E</u> C <u>P</u> K <u>C</u> <u>P</u> A <u>P</u> E | 35 |
| 5 | 185 | 203 | <u>D</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>S</u> | 19 |
| 6 | 212 | 214 | <u>R</u> <u>I</u> <u>Q</u> | 3 |
| 7 | 246 | 249 | <u>Q</u> <u>T</u> <u>R</u> | 3 |
| 8 | 290 | 308 | <u>E</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> | 18 |
| 9 | 318 | 326 | <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>Q</u> | 9 |

S é o número da seqüência; I é a posição do aminoácido inicial; T é a posição do aminoácido terminal. N é o número de aminoácidos na seqüência. Os resíduos sublinhados têm uma exposição ao solvente superior a 30%.

As nove seqüências acima apresentaram as melhores características para o comportamento como epítopos lineares. Algumas são muito longas, como a 4, que pode conter mais de um epítipo. Outras são muito curtas, como 6 e a 7, que apresentaram três aminoácidos. Por esses motivos, a princípio os melhores candidatos seriam as seqüências 5 e 8.

Um problema com o resultado da predição é que apesar de indicar bons candidatos a epítopos, a predição não determina as diferenças de reatividade de cada um dos epítopos, ou seja, não dá uma informação quantitativa sobre os diferentes epítopos.

Para a confirmação dos resultados da predição e para termos uma informação quantitativa, ou seja, de diferença de reatividade entre os epítopos, foi realizado o mapeamento de epítopos na IgG eqüina.

4.2.2 – Determinação de Epítomos Lineares da IgG3 por spot síntese

A predição de epítomos ajuda a determinar seqüências que são bons candidatos a epítomos, porém os resultados da predição não substituem o mapeamento dos epítomos, ou seja, a determinação dos epítomos por métodos experimentais.

O mapeamento de epítomos é um conjunto de técnicas que permite determinar os trechos da seqüência que efetivamente são reconhecidos por anticorpos. Dentre as várias técnicas que podem ser usadas para essa finalidade temos o ELISA (TRIBBICK, 2002) a espectrometria de massa (HARGER-BRAUN, 2005) e a síntese de peptídeos em spot (FRANK, 1992), técnica utilizada nesse trabalho.

A síntese de peptídeos em spot permite determinar tanto epítomos conformacionais como epítomos lineares. Para a determinação de epítomos conformacionais é utilizada a estratégia do mimotopo (REINEKE, et al 2002), ou seja, peptídeos que mimetizam epítomos conformacionais. Para a determinação de mimotopos por spot síntese é necessário o preparo de um grande número de seqüências randômicas, para encontrar as mais reativas frente ao soro que se pretende estudar. Esse processo demanda a síntese de um grande número de spots, com investimento de recursos e tempo maior que o necessário para a determinação de epítomos lineares.

Por esse motivo, nesse trabalho foram determinados apenas os epítomos lineares. Essa opção foi também embasada pelos resultados da predição de epítomos, que demonstraram evidências de bons epítomos lineares.

O primeiro passo para o mapeamento de epítomos da imunoglobulina eqüina foi a programação de síntese das seqüências dessa proteína. Foi utilizada a seqüência primária do isotipo IgG3, a mesma utilizada na predição de epítomos. São ao todo 354 resíduos, sendo programada a síntese de peptídeos com quinze aminoácidos (N=15), avançando seqüencialmente na cadeia cinco aminoácidos por spot (n=5). Essa programação levou a síntese de um total de 69 peptídeos. As seqüências dos peptídeos sintetizados são mostradas na Figura 34.

Figura 34: Peptídeos sintetizados a partir da seqüência do isotipo IgG3 da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina.

| Nº | Seqüência |
|----------------|------------------|
| 1 ^A | ASTTAPKVFPLAPSC |
| 2A | PKVFPLAPSCGTTSD |
| 3A | LAPSCGTTSDSTVAL |
| 4A | GTTSDSTVALGCLVS |
| 5A | STVALGCLVSSYFPE |
| 6A | GCLVSSYFPEPVTVS |
| 7A | SYFPEPVTVSWNSGT |
| 8A | PVTVSWNSGTLTSGV |
| 9A | WNSGTLTSGVRTFPS |
| 10A | LTSGVRTFPSVLQSS |
| 11A | RTFPSVLQSSGLYSL |
| 11A | RTFPSVLQSSGLYSL |
| 12A | VLQSSGLYSLSSMVT |
| 13A | GLYSLSSMVTVPASS |
| 14A | SSMVTVPASSLESKT |
| 15A | VPASSLESKTYICNV |
| 16A | LESKTYICNVAHPAS |
| 17A | YICNVAHPASSTKVD |
| 18A | AHPASSTKVDKRIEP |
| 19A | STKVDKRIEPVLPKP |
| 20A | KRIEPVLPKPTTPAP |
| 21A | VLPKPTTPAPTVPPLT |
| 21A | VLPKPTTPAPTVPPLT |
| 22A | TTPAPTVPPLTTTVPV |
| 23A | TVPLTTTVPVETTTTP |
| 24A | TTVPVETTTTPPCPCE |
| 1B | ETTTTPPCPCECPKCP |
| 2B | PCPCECPKCPAPELL |
| 3B | CPKCPAPELLGGPSV |
| 4B | APELLGGPSVFIFPP |
| 5B | GGPSVFIFPPKPKDV |
| 6B | FIFPPKPKDVLMITR |
| 7B | KPKDVLMITRTPEVT |
| 7B | KPKDVLMITRTPEVT |
| 8B | LMITRTPEVTCLVVD |
| 9B | TPEVTCLVVDVSHDS |
| 10B | CLVVDVSHDSSDVLV |
| 11B | VSHDSSDVLFTWYVD |
| 12B | SDVLFTWYVDGTEVK |
| 13B | TWYVDGTEVKTAKTM |
| 14B | GTEVKTAKTMPNEEQ |
| 15B | TAKTMPNEEQNNSTY |
| 16B | PNEEQNNSTYRVVSV |
| 17B | NNSTYRVVSVLRIQH |

Figura 34 (continuação): peptídeos sintetizados a partir da seqüência do isotipo IgG3 da cadeia pesada da imunoglobulina eqüina.

| Nº | Seqüência |
|-----|-----------------|
| 17B | NNSTYRVVSVLRIQH |
| 18B | RVVSVLRIQHQDWLN |
| 19B | LRIQHQDWLNGKKFK |
| 20B | QDWLNGKKFKCKVNN |
| 21B | GKKFKCKVNNQALPA |
| 22B | CKVNNQALPAPVERT |
| 23B | QALPAPVERTISKAT |
| 24B | PVERTISKATGQTRV |
| 1C | ISKATGQTRVPQVYV |
| 2C | GQTRVPQVYVLAPHP |
| 3C | PQVYVLAPHPDELSK |
| 3C | PQVYVLAPHPDELSK |
| 4C | LAPHPDELSKNKVS |
| 5C | DELSKNKVSVTCLVK |
| 6C | NKVSVTCLVKDFLPT |
| 7C | TCLVKDFLPTDITVE |
| 8C | DFLPTDITVEWQSNE |
| 9C | DITVEWQSNEHPEPE |
| 10C | WQSNEHPEPEGKYRT |
| 11C | HPEPEGKYRTTEAQK |
| 12C | GKYRTTEAQKSDGS |
| 13C | TEAQKSDGSYFLYS |
| 13C | TEAQKSDGSYFLYS |
| 14C | DSDGSYFLYSKLTVE |
| 15C | YFLYSKLTVETDRWQ |
| 16C | KLTVETDRWQQGTF |
| 17C | TDRWQQGTFTCVVM |
| 18C | QGTFTCVVMHEALH |
| 19C | TCVVMHEALHNHVMQ |
| 20C | HEALHNHVMQKNVSH |
| 21C | HNHVMQKNVSHSPGK |

A revelação da membrana foi feita utilizando um soro comercial de coelho contra imunoglobulina eqüina, conjugado a fosfatase alcalina. Esse soro é não específico para isotipo, sendo a princípio reativo contra todos os isotipos de cadeia pesada e cadeia leve. Também não é específico para nenhuma região da molécula, reagindo com C_L dobradiça, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} .

O resultado da revelação da membrana é mostrado na Figura 35. A primeira análise da membrana mostrou que vários spots não desenvolveram cor, alguns desenvolveram com pouca intensidade, e outros foram muito intensos.

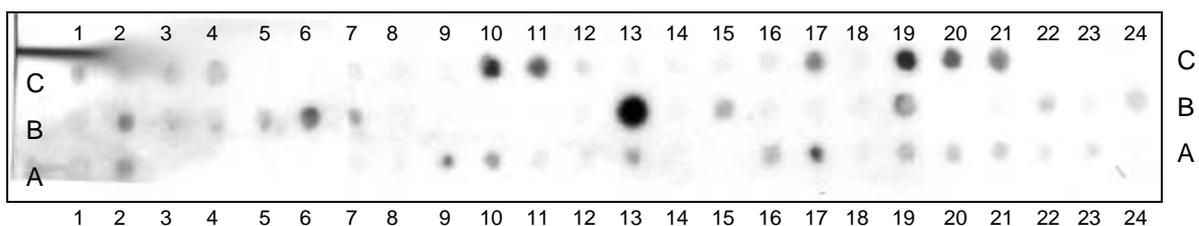


Figura 35: Resultado da revelação da membrana de mapeamento de epítomos da IgG3 eqüina. Cada ponto é um spot que apresentou reatividade frente o soro policlonal de coelho contra a IgG de cavalo.

Para a determinação dos spots mais intensos, essa membrana foi submetida a densitometria, sendo que os resultados são mostrados nas Figuras 36(A), 36(B) e 36(C). A análise densitométrica levou a seleção de dezenove spots, que apresentaram a D.O. mais intensa. Esses spots são mostrados na Tabela 33.

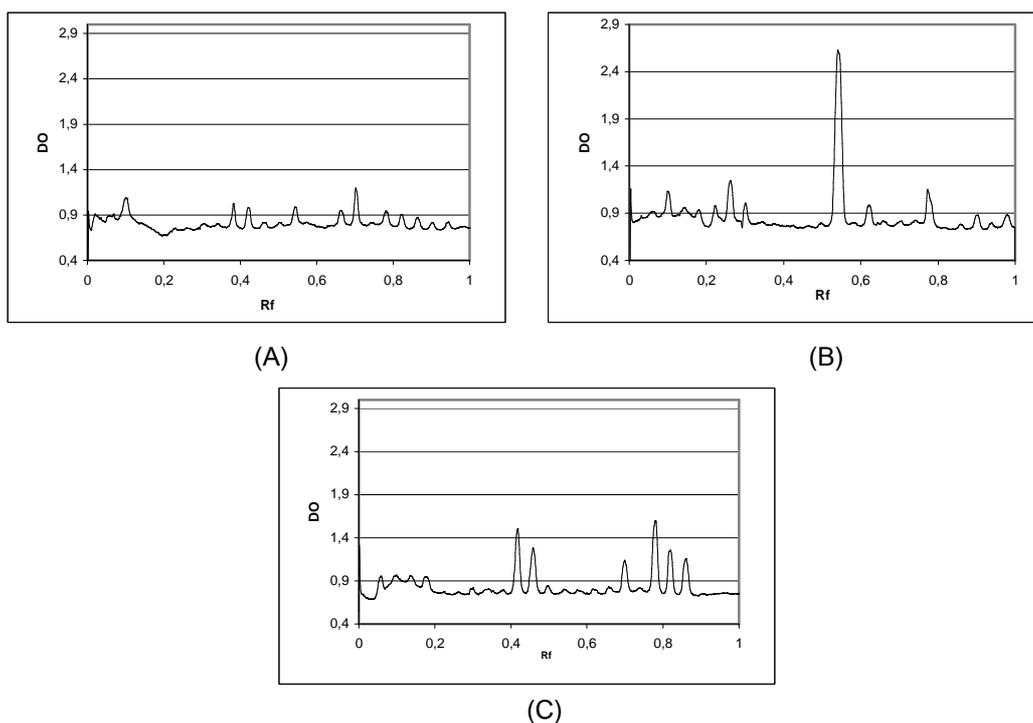


Figura 36: Densitometria dos spots da membrana mostrada na Figura 35. Cada gráfico corresponde a uma linha da membrana.

Tabela 33: Número e seqüências dos spots com D.O. mais intensas, mostrados na Figura 36

| Nº | Seqüência | DO |
|-----|-----------------|------|
| 1A | ASTTAPKVFPLAPSC | 1,02 |
| 2A | PKVFPLAPSCGTTSD | 1,01 |
| 9A | WNSGTLTSGVRTFPS | 1,02 |
| 10A | LTSGVRTFPSVLQSS | 0,98 |
| 13A | GLYSLSSMVTVPASS | 0,99 |
| 16A | LESKTYICNVAHPAS | 0,94 |
| 17A | YICNVAHPASSTKVD | 1,2 |
| 2B | PCPCECPKCPPELL | 1,15 |
| 5B | GGPSVFIFPPKPKDV | 1,01 |
| 6B | FIFPPKPKDVLMITR | 1,27 |
| 7B | KPKDVLMITRTPEVT | 0,98 |
| 13B | TWYVDGTEVKTAKTM | 2,65 |
| 15B | TAKTMPNEEQNNSTY | 0,96 |
| 19B | LRIQHQDWLNGKKFK | 1,14 |
| C10 | WQSNEHPEPEGKYRT | 1,51 |
| C11 | HPEPEGKYRTTEAQK | 1,29 |
| C17 | TDRWQQGTTFTCVVM | 1,14 |
| 19C | TCVVMHEALHNHVMQ | 1,6 |
| 20C | HEALHNHVMQKNVSH | 1,26 |
| 21C | HNHVMQKNVSHSPGK | 1,16 |

Na Tabela 33 podemos perceber spots adjacentes que desenvolveram cor e spots que desenvolveram cor isoladamente. A próxima etapa do trabalho foi alinhar as seqüências dos spots adjacentes que desenvolveram cor, para verificar os aminoácidos comuns, e dessa forma determinar os epítomos. A Figura 37 mostra os resultados do alinhamento dos spots adjacentes.

No caso de spots que desenvolveram cor isoladamente, consideramos que a seqüência de 15 aminoácidos corresponde ao epítomo. Embora epítomos lineares típicos tenham de 6 até 10 aminoácidos, as seqüências vicinais podem interferir na conformação local do epítomo, sendo também importantes para a antigenicidade (HARGER-BRAUN, 2005). Por isso, nesse caso, decidimos considerar as seqüências completas importantes para a antigenicidade do peptídeo.

1A, 2A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| A | S | T | T | A | P | K | V | F | P | L | A | P | S | C | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | P | K | V | F | P | L | A | P | S | C | G | T | T | S | D |

9A,10A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 60 | 61 |
| W | N | S | G | T | L | T | S | G | V | R | T | F | P | S | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | L | T | S | G | V | R | T | F | P | S | V | L | Q | S | S |

16A e 17A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 |
| L | E | S | K | T | Y | I | C | N | V | A | H | P | A | S | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | Y | I | C | N | V | A | H | P | A | S | S | T | K | V | D |

5B, 6B e 7B

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 |
| G | G | P | S | V | F | I | F | P | P | K | P | K | D | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | F | I | F | P | P | K | P | K | D | V | L | M | I | T | R | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | * | * | * | * | P | K | P | K | D | V | L | M | I | T | R | T | P | E | V | T |

10C e 11C

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 |
| W | Q | S | N | E | H | P | E | P | E | G | K | Y | R | T | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | H | P | E | P | E | G | K | Y | R | T | T | E | A | Q | K |

19C, 20C e 21C.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 |
| T | C | V | V | M | H | E | A | L | H | N | H | V | M | Q | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | H | E | A | L | H | N | H | V | M | Q | K | N | V | S | H | * | * | * | * |
| * | * | * | * | * | * | * | * | * | H | N | H | V | M | Q | K | N | V | S | H | S | P | G | K |

Figura 37: Alinhamento de seqüências dos spots reativos, para a determinação dos epítomos.

Com esses alinhamentos podemos consolidar o mapeamento dos epítomos lineares da IgG3 eqüina frente ao soro policlonal de coelho. Foram encontrados ao todo 12 epítomos diferentes. Na Tabela 34 são mostradas as seqüências e o domínio onde cada um desses epítomos se localiza. A distribuição desses epítomos ao longo da seqüência primária é mostrada na Figura 38.

Os diferentes epítomos também foram classificados em termos de antigenicidade, de acordo com a DO que cada um desenvolveu. Consideramos de baixa antigenicidade spots com DO até 50% (1,41) maior que o spot menos intenso, de média antigenicidade de 50 até 100% (1,88) acima do spot menos intenso; Os spots de alta antigenicidade apresentaram valores de DO acima de 1,88.

Tabela 34: Epítomos lineares presentes na IgG3 equina.

| Epítopo | Início | Término | Seqüência | N | Domínio | Reatividade |
|---------|--------|---------|------------------|----|-----------------|-------------|
| 1 | 6 | 15 | PKVFPLAPSC | 10 | C _{H1} | Baixa |
| 2 | 46 | 55 | LTSGVRTFPS | 10 | C _{H1} | Baixa |
| 3 | 62 | 76 | GLYSLSSMVTVPASS | 15 | C _{H1} | Baixa |
| 4 | 82 | 91 | YICNVAHPAS | 10 | C _{H1} | Baixa |
| 5 | 126 | 140 | PCPCECPKCPAPPELL | 15 | Dobradiça | Baixa |
| 6 | 151 | 155 | KPKDV | 5 | C _{H2} | Baixa |
| 7 | 181 | 195 | TWYVDGTEVKTAKTM | 15 | C _{H2} | Alta |
| 8 | 191 | 205 | TAKTMPNEEQNNSTY | 15 | C _{H2} | Baixa |
| 9 | 211 | 225 | LRIQHQDWLNGKFK | 15 | C _{H3} | Baixa |
| 10 | 291 | 300 | HPEPEGKYRT | 10 | C _{H3} | Média |
| 11 | 321 | 335 | TDRWQQGTTFTCVVM | 15 | C _{H3} | Baixa |
| 12 | 340 | 345 | HNHVMQ | 6 | C _{H3} | Média |

ASTTAPKVFPLAPSCGTTSDSTVALGCLVSSYFPEPVTVSWNSGTLTSGVRTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPASSLESKTYICNVAHPASSTKVDKRIEPLPKPTTPAPTVPPLTTTVPVETTTTPPCPCECPKCPAPPELLGGPSVFIFPPKPKDVLMITRTP EVTCLVVDVSHDSSDVLFTWYVDGTEVKTAKTMPNEEQNNSTYRVVSVLRIQHQDWLNGKFKCKVNNQALPAPVERTISKATGQTRVPQVYVLAPHPDELSKNKVSVTCLVKDFLPTDITVEWQSNEHPEPEGKYRTTEAQKSDSGSYFLYSKLTVETDRWQQGTTFTCVVMHEALHNHVMQKNVSHSPGK

Figura 38: Distribuição de epítomos na seqüência da IgG3

A classificação da intensidade dos spots demonstrou que os epítomos de alta e média antigenicidade se encontram em F_c. Esse resultado é compatível com observações anteriores por imunodifusão (HELMS & ALLEN, 1970), ELISA (RATANABANANGKOON et al, 1997) e immunoblot (seção 4.1.4.1 desse trabalho) de que soro policlonal de coelhos reconhece de forma muito mais intensa a IgG que o fragmento F(ab')₂.

A constatação dessa diferença também é importante para mostrar a viabilidade da idéia do uso desses epítomos para a o preparo de soros específicos contra a IgG, com reatividade adequada para o uso em cromatografia de imunoafinidade.

A submissão da IgG3 a um processo de mapeamento de epítomos por spot sínteses levou a determinação de doze epítomos lineares. Com esse resultado, foi possível comparar a predição de epítomos com os resultados experimentais. A comparação foi sumarizada na Tabela 35.

Tabela 35: Comparação dos resultados da predição com os resultados de mapeamentos de epítomos. O valor de acurácia foi calculado com base no número epítomos determinados.

| Epítopo | Jameson Wolf | Kolaskar | Bepipred |
|----------|--------------|----------|----------|
| 1 | Não | Sim | Sim |
| 2 | Não | Sim | Sim |
| 3 | Não | Sim | Sim |
| 4 | Sim | Sim | Sim |
| 5 | Sim | Sim | Sim |
| 6 | Sim | Sim | Sim |
| 7 | Sim | Não | Sim |
| 8 | Sim | Sim | Não |
| 9 | Sim | Sim | Sim |
| 10 | Sim | Não | Sim |
| 11 | Sim | Sim | Sim |
| 12 | Não | Não | Não |
| Acurácia | 66,7% | 75% | 83,3% |

As escalas de Koloskar e Bepipred apresentaram uma acurácia maior que a de Jameson-Wolf. Essas escalas utilizam informação de freqüência de ocorrência dos aminoácidos em epítomos, o que talvez explique a essa diferença.

A escala de Kolaskar não previu o epítopo sete, justamente o mais reativo. Talvez esse fato deva-se a ausência, nessa escala, de um parâmetro que relacione características da estrutura secundária com a antigenicidade.

Uma contribuição importante para melhorar a acurácia da predição foi o alinhamento das seqüências e a modelagem molecular, que eliminaram vários candidatos que na prática se mostraram não reativos. Tais resultados também ajudam a explicar as diferenças de antigenicidade observadas entre os epítomos detectados.

Os epítomos que apresentaram menor reatividade frente ao soro policlonal foram justamente aqueles com maior homologia entre as seqüências de coelho e cavalo. Nos epítomos 2 e 6, por exemplo, ocorre apenas uma diferença entre as seqüências dos dois animais.

Os três principais epítomos apresentaram uma característica importante para o desenvolvimento de ensaios de captura, que é a distância entre eles (MOLINA et al, 2008). Essa distância é mostrada na Figura 39. A reação entre anticorpos e o epítoto 7, por exemplo, não interfere na reação entre os anticorpos e o epítoto 10. A maior possibilidade de interferência ocorre entre os epítotos 10 e 12, que são relativamente próximos.

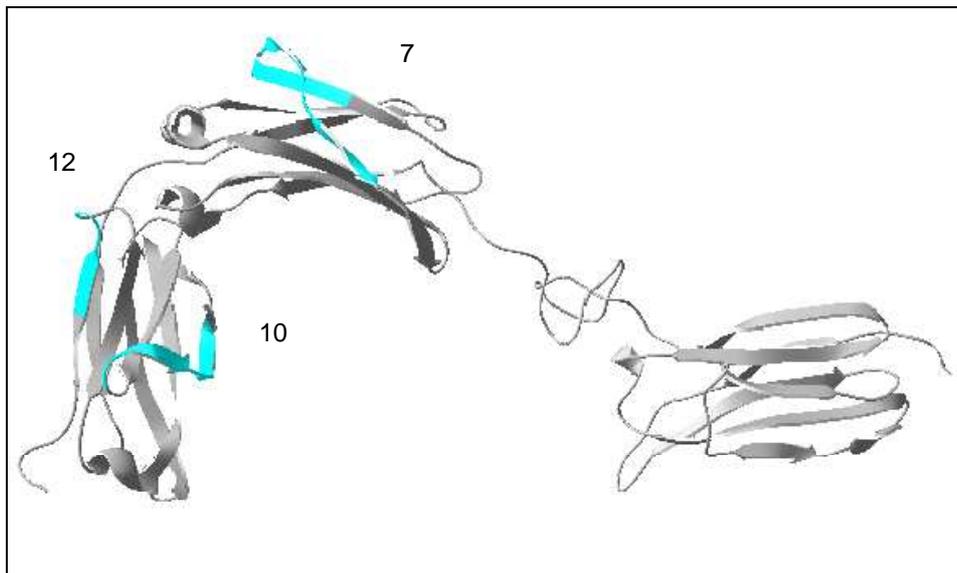


Figura 39: Vista dos três principais epítomos no modelo da IgG3 eqüina.

Devido a maior reatividade o epítoto sete foi selecionado para a validação utilizando o ELISA.

4.2.3 – Confirmação do Epítopo sete por ELISA

Um bom processo de validação de epítomos determinados por spot síntese é o uso de um método como o ELISA (LAUNE et al, 2002). O peptídeo sintético com a seqüência do epítopo deverá bloquear a ligação do anticorpo ao antígeno fixo na placa, demonstrando que ocorre a reação antígeno-anticorpo em solução.

A primeira questão para o estabelecimento desse ELISA foi o antígeno a ser utilizado para o recobrimento da placa. Para essa finalidade utilizamos um concentrado de imunoglobulinas eqüinas, preparado a partir da fração de plasma eqüino não ligada a cibacron Blue, descrito no item 4.1.3.

O ELISA de competição deve ser planejado para que a absorbância na ausência de competidor seja da ordem de 1,0, decaindo a partir desse valor (LUCAS et al, 2004). Para estabelecermos essas condições, utilizamos o planejamento fatorial.

O planejamento fatorial é um conjunto de métodos estatísticos que permite a otimização de experimentos, com economia de tempo e recursos (JOHANSSON & HELLENÄS, 2004). Nesse caso preparamos três níveis de concentração de antígeno imobilizado na placa e três níveis de diluição de anticorpo conjugado a fosfatase alcalina, conforme mostrado na Figura 40.

As médias de cinco leituras em cada uma das condições foram lançadas no programa statistica, e geraram o gráfico mostrado na Figura 38. Com os resultados desse gráfico, pode-se concluir que uma D.O. de 1,0 seria atingida com uma solução de recobrimento de 80µg/mL de IgG eqüina, e uma diluição do anticorpo conjugado de 1: 17000. Trabalhamos então com a solução de recobrimento com 80 µg/mL, e com a diluição de anticorpo de 1:15000.

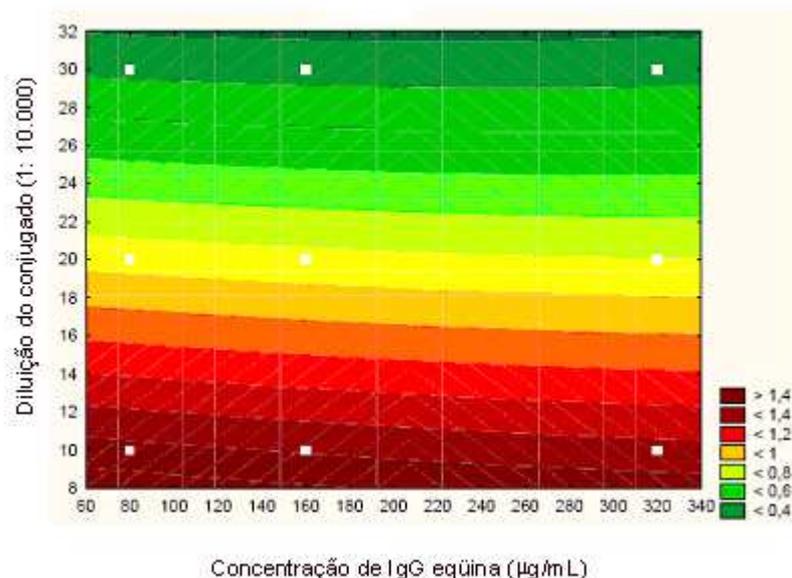


Figura 40: Gráfico Resultante do planejamento fatorial aplicado à otimização das condições de Elisa, utilizando um concentrado de IgG eqüina para o recobrimento da placa e o anticorpo comercial conjugado a fosfatase alcalina para revelação. Os pontos brancos representam as condições lidas. A escala de cores representa a D.O esperada em 405 nm.

Além de estabelecer as condições do ELISA, para a realização desse ensaio é necessário um peptídeo sintético (PS) com seqüência similar a do epítipo. Solicitamos o preparo de um PS semelhante ao epítipo 07, acrescido de dois resíduos de glicina no N terminal e dois resíduos de glicina no C terminal, conforme mostrado na Figura 41.



Figura 41: Comparação entre o epítipo sete (primeira linha) e o peptídeo sintético usado em ELISA de competição (segunda linha)

A adição dos resíduos de glicina foi feita com duas finalidades. Na proteína o epítipo não é flanqueado pelas cargas do N e do C terminal. A adição dos resíduos de glicina “afasta” essas cargas do epítipo, de forma que ele se assemelha mais a sua estrutura nativa. A glicina é utilizada por ser um aminoácido que não irá interferir na conformação do epítipo.

O segundo motivo para o uso da glicina foi termos um grupo que proporcionasse a ligação do epítipo a uma proteína carreadora, para o preparo do conjugado.

O efeito da incubação de concentrações crescentes do PS com o soro comercial policlonal de coelho conjugado com a fosfatase na inibição por ELISA é representado na Figura 42.

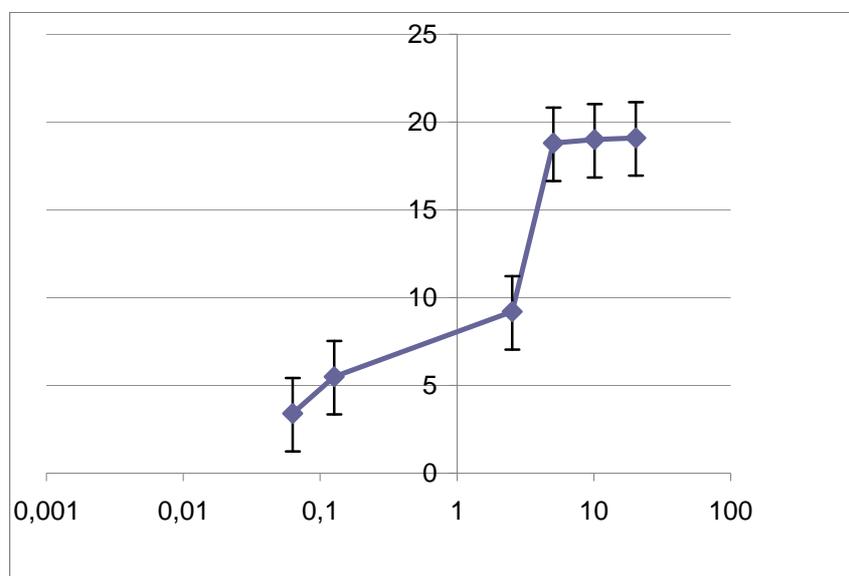


Figura 42: Elisa de competição entre o soro comercial conjugado a fosfatase alcalina e o PS.

O experimento de competição demonstrou que numa concentração de 8 μM ocorre a inibição de 19 % da resposta do soro. Esse resultado confirmou que a seqüência do epitopo sete tem uma alta afinidade pelo soro poli clonal de coelhos. Esse valor de inibição deve ser considerado relevante. O PS bloqueia a ligação de um único epitopo no soro policlonal, não interferindo na ligação dos demais dez epitopos lineares e nos epítopos conformacionais, tanto da cadeia pesada como da cadeia leve.

Essa confirmação tornou possível utilizar o PS para o preparo de um conjugado visando a imunização de coelhos.

4.2.4 – Preparo dos Anticorpos Contra o Epítopo sete

4.2.4.1 – Preparo do Antígeno para Imunização dos Animais

Uma vez determinado e validado o epítopo principal da IgG eqüina, a próxima etapa do trabalho foi o preparo de um anticorpo específico contra esse epítopo. Para esse preparo foi utilizado o mesmo PS utilizado no Elisa de competição.

O problema da falta de imunogenicidade de peptídeos foi contornado se conjugado o PS com o TT (KLUBER-KIELB et al, 2006). A primeira etapa dessa conjugação foi a ativação do TT com EDC, e formação do éster reativo intermediário pela adição de NHS. O intermediário formado tem uma absorção bastante característica no ultravioleta, que o diferencia do TT não ativado. Essa diferença deve-se a modificação química das cadeias laterais dos resíduos de aspartato/glutamato. A conversão dos grupos ácidos em O-acil-uréia e posterior formação do éster NHS leva a essas mudanças na absorção.

A ativação do TT foi acompanhada monitorando-se então a absorbância em 260 nm (MIRSKY et al, 2002). A diferença dos valores de absorbância da solução de TT antes (0,48) e depois da ativação (2,29) garantiu que a ativação do TT se deu com sucesso.

Após a ativação a próxima etapa foi a conjugação do TT ao PS. Essa reação foi então monitorada por cromatografia de gel filtração. A determinação de seu peso molecular por interpolação com padrões (Figura 43) levou a um valor de 200 kDa, conforme mostrado na Tabela 36. O cromatograma do TT é mostrado na Figura 44(a).

O TT tem em sua superfície aproximadamente 50 grupos carboxilatos¹ que podem ser ativados. Como o PS tem um peso molecular de cerca de 2 kDa, a ligação a todos os sítios na superfície do TT levaria a um conjugado de no máximo 300 kDa de peso molecular.

O cromatograma do conjugado formado é mostrado na Figura 44(b). Pode-se observar que o pico com o tempo de retenção do TT desapareceu. Formaram-se três outros picos no cromatograma. As características desses picos são listadas na Tabela 36.

¹ Comunicação pessoal, Dra Ivna Alana, Bio-manguinhos Fiocruz.

O primeiro pico tem um tempo de retenção de 8,6 min, que corresponde a um peso molecular de aproximadamente 1090 kDa. Esse valor está acima do valor máximo esperado, mesmo que ocorresse a conjugação em todos os sítios presentes na superfície do TT.

O segundo pico apresentou um peso molecular de aproximadamente 270 kDa, sendo provavelmente o produto da conjugação de cerca de 40 unidades do peptídeo a proteína carreadora.

O terceiro pico tem um tempo de retenção de aproximadamente 19 min. Esse pico encontra-se na faixa de inclusão total da coluna, correspondendo a subprodutos do processo de conjugação entre o peptídeo sintético e a proteína. O principal subproduto que absorve luz nesse comprimento de onda é o excesso de PS que não reagiu. Subprodutos da conjugação, como o NHS e a etil-N,N-dimetilamino-propil-uréia (EDU), também se encontram nesse pico.

Tabela 36: Características dos picos do cromatograma do TT e do cromatograma do produto da reação de conjugação entre o TT e o PS

| Pico | Tempo de retenção | Percentual | Peso molecular |
|------|-------------------|------------|----------------|
| TT | 12,0 min. | - | 200 kDa |
| 01 | 8,6 min. | 91,6 % | 1090 kDa |
| 02 | 11,2 min. | 8,4 % | 270 kDa |
| 03 | 19,2 min. | - | - |

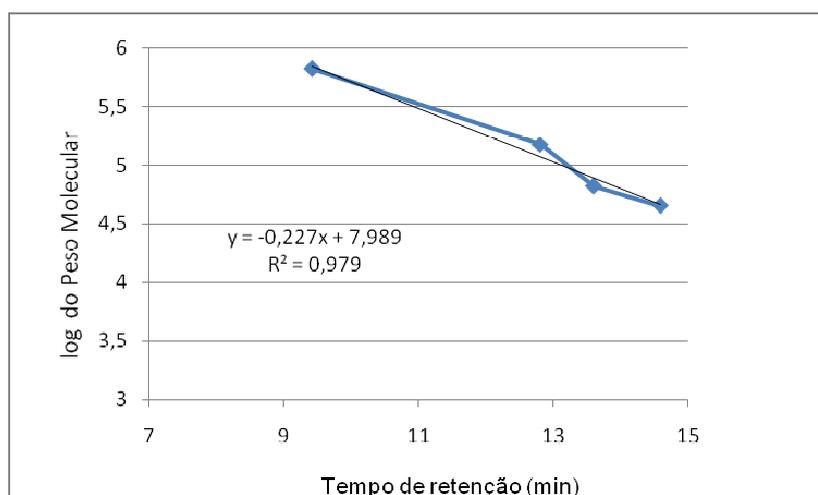
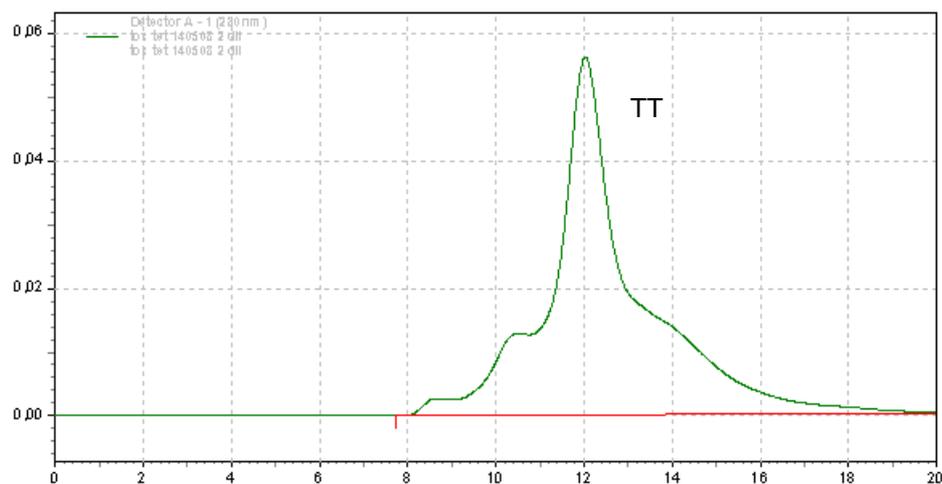
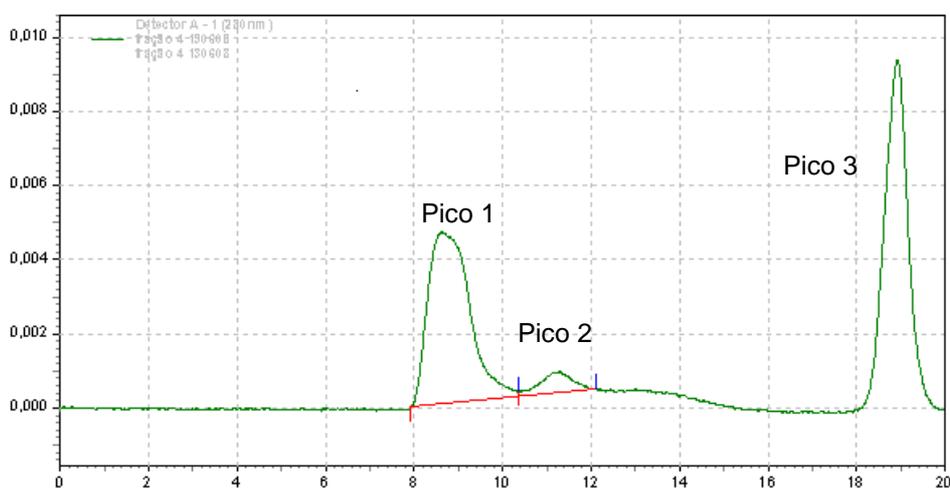


Figura 43: Curva de distribuição de peso molecular da coluna TSK SW_{XL} 3000. No eixo horizontal é mostrado o tempo de retenção em minutos e no eixo vertical o log do peso molecular dos padrões usados para calibrar a coluna.



(a)



(b)

Figura 44: Uso da CLAE no acompanhamento do processo de conjugação TT-PS (a) Cromatograma do TT por gel filtração. (b) Cromatograma do conjugado TT-PS por gel filtração. O pico de 19 min encontra-se na inclusão total e corresponde a resíduos do processo de conjugação.

A formação de um produto principal de alto peso molecular nos levou a acreditar que além da formação da conjugação esperada, mostrada na Figura 44(a), também ocorreu a conjugação cruzada, ou seja, uma molécula de PS reagiu com duas moléculas de TT. A formação de conjugados cruzados pode ser explicada pela reação entre as cadeias laterais dos resíduos de lisina e os grupos ativados na superfície do TT, conforme mostrado na Figura 44.

Diante das evidências da formação de conjugados cruzados, pode-se imaginar que ocorreu a conjugação central, conforme mostrado na Figura 45

(d). Ou seja, em alguns peptídeos a ligação principal com o TT deve ter ocorrido pelos resíduos de lisina e não pelo N-terminal do peptídeo.

Com esses resultados, buscamos na literatura informações de como a formação desse tipo de conjugado poderia afetar a imunização dos animais e no título de anticorpos formados contra a proteína de interesse.

A influência da orientação do conjugado sobre o título de anticorpos já foi estudada anteriormente, com métodos de conjugação diferentes do utilizado nesse trabalho.

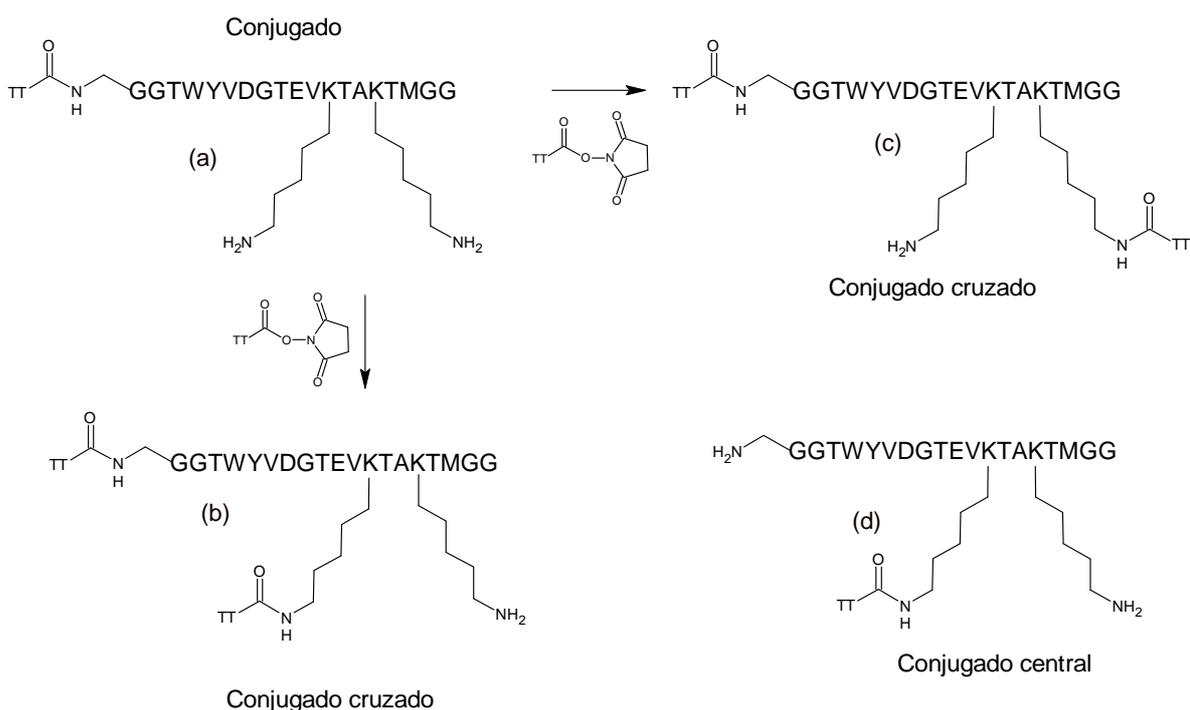


Figura 45: Formação de conjugados cruzados entre o TT e o PS (a) conjugado do N terminal com o TT (b) e (c) são duas possibilidades de conjugação cruzada. (d) conjugado central do PS com o TT.

O método do espaçador MBS (ácido meta-maleídoimido benzóico) permite um controle da orientação dos conjugados formados. Nesse método o MBS é ligado à proteína carreadora, via resíduos de lisina. O peptídeo sintético é conjugado a proteína por uma reação de adição a ligação dupla do grupo maleídoimido (TAM, 1993) (Figura 46). Para o uso desse espaçador é necessário que o peptídeo sintético tenha uma cisteína, que participará, com o grupo sulfeto, na reação de adição. Essa cisteína pode ser colocada no N-terminal, C-terminal ou no meio da seqüência. Dessa forma, variando a

posição da cisteína pode ligar o peptídeo por uma das extremidades seletivamente ou pelo meio da seqüência, conforme mostrado na Figura 46.

A preparação de conjugados com orientação específica demonstrou pequenas diferenças nos anticorpos formados. Os conjugados de extremidade apresentaram um título menor, porém a afinidade dos anticorpos formados foi maior. Os conjugados centrais formaram um título maior de anticorpos, porém os anticorpos formados tiveram uma afinidade ligeiramente menor (BRUUN et al, 2006)

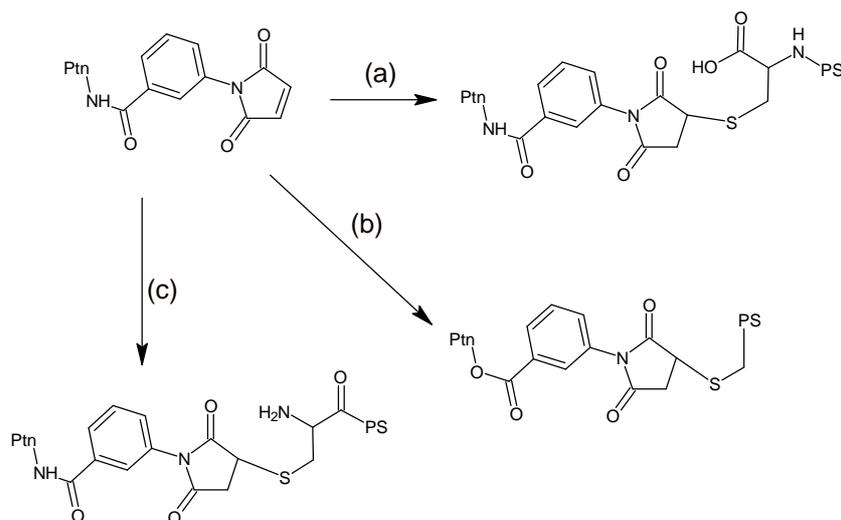


Figura 46: Possibilidades de conjugação com o MBS. No canto superior esquerdo é mostrado o conjugado MBS proteína. (a) conjugação com uma cisteína no C-terminal (b) conjugação com a cisteína central (c) Conjugação com cisteína no N-terminal. Ptn é a proteína carreadora.

Essas observações nos levarão a crer que a imunização dos animais com esses conjugados deveria produzir anticorpos que reconheceriam a o epítipo 07 da IgG eqüina. Prosseguimos então com a imunização dos coelhos.

4.2.4.2 – Imunização dos Animais

Para a imunização dos animais os conjugados preparados foram então emulsionados com adjuvante de Freund e injetados em coelhos. Para acompanhar o título do soro formado foi coletado sangue dos animais no dia da terceira imunização e vinte e um dias após essa aplicação.

Para acompanhar a formação dos anticorpos nos animais foi utilizado o método de Elisa. No uso dessa técnica para acompanhar a formação de anticorpos é comum recobrir a placa com o peptídeo sintético, ou ligar o peptídeo sintético com uma proteína que funciona como carreador irrelevante. No nosso caso, decidimos recobrir a placa com o concentrado de IgG eqüina que foi preparado a partir do plasma de cavalo. Dessa forma, teríamos o título do soro contra a proteína de interesse e não contra o peptídeo sintético.

Os resultados da imunização são mostrados na Figura 47. Nesse gráfico pode-se perceber que o título formado para os dois animais foi bastante relevante, demonstrando que após a terceira imunização o reconhecimento da IgG eqüina é intenso.

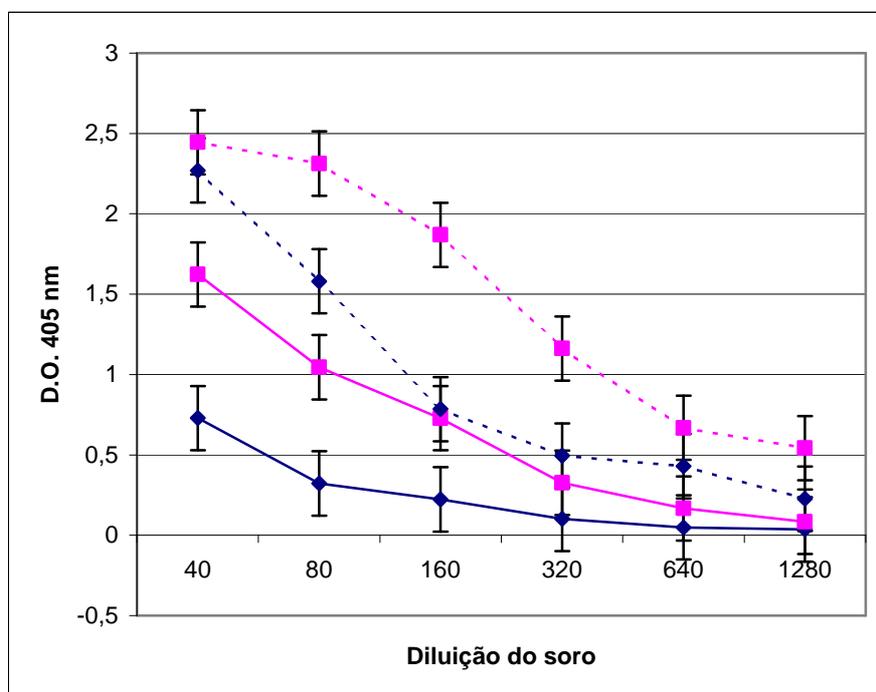


Figura 47: Titulação do soro de coelho imunizado com o conjugado TT-PS. As linhas sólidas correspondem aos títulos no dia do segundo reforço. As linhas pontilhadas correspondem ao título no 21º após o segundo reforço. As Em rosa é mostrado o título do coelho 01 e em azul o título do coelho 02.

Como acompanhamento também foi avaliada a reação do soro ao TT. A D.O. encontrada foi muito baixa, demonstrando que o peptídeo sintético ocupou a maior parte dos sítios de conjugação presentes na superfície do TT.

Esse resultado demonstrou que houve a formação de um título elevado de anticorpos contra a IgG eqüina, nos dois coelhos. Com a formação desses anticorpos, a principal dificuldade para o desenvolvimento de método rápido para a detecção de IgG em soros foi superada.

5 – Discussão

5.1 – Avaliações da Pureza de Soros Antiofídicos

O teor de proteína total presente numa amostra de soro antiofídico é o primeiro parâmetro que avalia a purificação que o material foi submetido. Esse teor é correlacionado a capacidade de neutralização do plasma hiperimune sobre os efeitos do veneno. Se essa capacidade é elevada, a diluição subsequente será grande, diminuindo o teor de proteína total. Se o efeito é baixo, a diluição será necessariamente menor, e o teor final de proteína será mais elevado.

Esse ensaio também é muito importante, porque ele fornece quanto de proteína heteróloga o usuário do soro receberá para neutralizar o efeito do veneno. Assim, se a capacidade de neutralização for muito baixa, a quantidade de proteína heteróloga será elevada, aumentando a ocorrência dos efeitos adversos.

O teor de proteínas encontrado nas amostras de SAB analisadas nesse trabalho está bastante abaixo do valor sugerido pela F.B. Esse valor também é próximo ao de produtores internacionais que utilizam processo baseado em precipitação com AC, que é, segundo alguns autores, o processo que alcança a melhor relação custo benefício para produtores de países em desenvolvimento (GUTIERREZ et al, 2007).

O segundo determinante no teor de proteínas de um soro é o processo de purificação do plasma hiperimune. A purificação diminui o efeito neutralizante inicial (RATANABANANGKOON et al, 1997), porém aumenta muito a atividade específica, ou seja, a razão entre a proteína total e o efeito neutralizante, na medida que remove as proteínas que não contribuem para esse efeito.

A avaliação qualitativa das proteínas presentes demonstrou a necessidade da melhora do processo de purificação dos soros antiofídicos nacionais. O teor de proteína diferente do $F(ab')_2$ é elevado, e a comparação com os produtores internacionais (tabela 14), demonstra a necessidade do incremento dos processos industriais.

Para uma melhor compreensão das falhas do processo de purificação de cada um dos produtores foi necessário tentar caracterizar as proteínas

contaminantes presentes. Os resultados das avaliações por immunoblot e eletroforese bidimensional/espectrometria de massas demonstraram que os principais contaminantes são IgG, ESA de origem asina, produtos de proteólise parcial da ESA e da região variável da IgG.

A identificação da IgG confirma que em vários lotes a hidrólise pela pepsina não foi completa, sendo necessário um maior controle de processo nessa etapa, principalmente no produtor B. O produtor A apresentou a menor média de teor de IgG, enquanto o produtor C apresentou uma incidência menor desse contaminante. Tais resultados demonstram a necessidade de estabelecimento de controles em processo, para a liberação da etapa de hidrólise por pepsina.

Vários artigos citam a IgG como um contaminante em soros antiofídicos tratados com pepsina (WARRELL et al, 1993; RATANABANANGKOON & RAWEERITH, 2003; MORAES & MASSALDI, 2005). Apesar disso, poucos autores citam os valores da contaminação por IgG. Os produtores nacionais têm valores residuais mais próximos do produtor do Egito que dos fabricantes dos EUA e Inglaterra.

A presença de IgG em soros que a princípio são constituídos de $F(ab')_2$ é considerada irregular pela F.E. 5ª Ed (Tabela 06). Dessa forma, a avaliação dos resultados utilizando esse critério levaria a reprovação de 4 lotes do produtor A, 7 lotes do produtor B e 2 do produtor C.

A identificação da presença de albumina de jumento no soro demonstrou que o produtor utiliza esse animal ou mulas, animais híbridos obtidos do cruzamento de éguas com jumentos, na preparação dos soros. A legislação em vigor não veta o uso desses animais, uma vez que os soros podem ser obtidos a partir de plasma de eqüídeos (BRASIL, 1996). Deve ser destacado que os soros brasileiros são considerados sempre como derivados de plasma de cavalos (SILVA et al, 1989; WARRELL et al, 1993; GUTIERREZ et al, 2007).

O uso de animais de diferentes espécies pode acarretar outro problema. Diferenças nas seqüências podem modificar sítios de hidrólise pela pepsina. Tais mudanças podem levar a diferenças nas melhores condições para o processamento do plasma. É possível, por exemplo, que num tempo que a imunoglobulina de cavalo tenha sido completamente hidrolisada, formando $F(ab')_2$, a de jumento não tenha sido. Da mesma forma podem existir diferenças entre a velocidade de hidrólise das albuminas.

Além disso, a albumina de cavalo é um dos alérgenos desse animal para o homem (BOTROS et al, 2001; DEMOLY et al, 2002). Pacientes com alergias a albuminas de animais domésticos, como o cão e o gato, podem também ter alergia a ESA (DANDEU et al, 1996). Foi observado também que pessoas com esse tipo de alergias que utilizaram soros antitóxicos tiveram reações anafiláticas (DEMOLY et al, 2002). Devido a elevada similaridade das seqüências (98%; sete diferenças em 583 resíduos), a albumina de jumento também será alérgica ao homem.

Devido a essa característica da ESA, a F.E. V Ed. estabelece um limite de máximo de 3% para o teor dessa proteína em soros, valor abaixo do encontrado na maioria dos lotes analisados.

Podemos observar que os soros nacionais apresentam um teor de ESA menor que o produto internacional que usa a mesma tecnologia de produção, sendo que outras tecnologias de purificação atingem uma redução maior do teor de albumina.

A maior parte da ESA sofre uma proteólise parcial durante o processamento dos soros, formando um artefato estabilizado por pontes dissulfeto. A comparação dos trechos antigênicos da seqüência da ESA com os fragmentos formados durante o processamento dos soros antiofídicos demonstra que não há uma garantia da inativação completa do potencial alérgico dessa proteína, condições utilizadas.

O último tipo de artefato identificado nos soros antiofídicos foram seqüências relacionadas a regiões variáveis de cadeia pesada de IgG. Pode-se deduzir que a pepsina, além de promover a hidrólise rápida da região da dobradiça, também hidrolisa a região variável das cadeias.

Esse resultado é bastante compatível com observações feitas na literatura, de que o tratamento de plasma hiperimune e anticorpos com pepsina levam a redução do título de afinidade pelo veneno (JONES & LANDON, 2002; RATANABANANGKON & RAWEEERITH, 2003; MORAIS & MASSALDI, 2005.) Os autores desses trabalhos observaram a redução da atividade, embora não tenha ocorrido uma modificação substancial do peso molecular avaliado por SDS-PAGE em condições não redutoras. A redução do peso molecular ocorre após um período longo de tratamento com a pepsina, o que leva a uma perda completa da capacidade de reconhecimento do veneno.

Como mostrado na figura 03, as estruturas dos domínios V_H e V_L são estabilizadas por pontes dissulfeto. Em condições não redutoras, produtos de hidrólise parcial pela pepsina podem manter seu peso molecular inalterado devido a essas pontes dissulfeto, sendo que em condições redutoras aparecem os peptídeos de menor peso molecular. Essa redução atividade após a hidrólise por pepsina pode ser explicada pela hidrólise da região V_H , que é a porção da IgG que reconhece o veneno.

5.2 – Preparo de Anticorpos para a Detecção de IgG em Soros Antiofídicos

A avaliação da pureza dos soros antiofídicos demonstrou que a IgG é um dos principais contaminantes presentes. Diferente da ESA, cujos efeitos adversos são mediados por respostas alérgicas, a presença de IgG pode provocar efeitos adversos em um número muito maior de pessoas. A IgG heteróloga pode ativar resposta anafilática por um mecanismo que não depende de características individuais como a alergia (WARRELL, 1993; DART, 2001).

Por esse motivo avaliação da presença de IgG em soros é muito importante. O SDS-PAGE é um método eficiente nessa determinação, porém sua realização é relativamente trabalhosa e os resultados levam até 4 h para ficar prontos.

A pressão por respostas rápidas é muito grande em processos produtivos. O acompanhamento de um processo de hidrólise da IgG por pepsina, por exemplo, não pode depender de um ensaio que demande 4h na sua realização.

Para o desenvolvimento de anticorpos específicos contra a IgG, a primeira avaliação feita foi a predição dos epítomos da IgG3 eqüina. A predição utilizando programas baseados em estrutura primária, o alinhamento de seqüências de cavalo/coelho e a avaliação do modelo da região constante da IgG3 levou a seleção de nove prováveis epítomos.

A submissão da IgG3 a um processo de mapeamento de epítomos por spot sínteses levou a determinação de doze epítomos lineares. Com esse resultado, foi possível comparar a predição de epítomos com os resultados experimentais

As escalas de Koloskar e Bepipred apresentaram uma acurácia maior que a de Jameson-Wolf. Essas escalas utilizam informação de frequência de ocorrência dos aminoácidos em epítomos, o que talvez explique a essa diferença.

A escala de Kolaskar não previu o epítomo sete, justamente o mais reativo. Talvez esse fato deva-se a ausência, nessa escala, de um parâmetro que relacione características da estrutura secundária com a antigenicidade.

Uma contribuição importante para melhorar a acurácia da predição foi o alinhamento das seqüências e a modelagem molecular, que eliminaram vários candidatos que na prática se mostraram não reativos. Tais resultados também ajudam a explicar as diferenças de antigenicidade observadas entre os epítomos detectados.

Os epítomos que apresentaram menor reatividade frente ao soro policlonal foram justamente aqueles com maior similaridade entre as seqüências de coelho e cavalo, mostradas no esquema 05. Nos epítomos 02 e 06 ocorre apenas uma diferença entre as seqüências dos dois animais.

Os epítomos mais reativos apresentaram propriedades comuns a seqüências antigênicas (MAYER, 2008). O epítomo sete tem um grande número de aminoácidos com alta exposição ao solvente, e apresenta uma grande divergência entre o coelho e o cavalo. Ao longo de sua extensão ocorrem duas alças diferentes, o primeiro na G_{186} , e os segundo $K_{190}-A_{192}$.

O modelo desse epítomo demonstrou a existência de pontes de hidrogênio entre os resíduos $Y_{183}-V_{189}$ e $W_{184}-T_{187}$ (figura 30). Essas interações podem influenciar a conformação do epítomo, contribuindo dessa forma para o reconhecimento dos anticorpos.

O epítomo dez tem algumas características em comum com o epítomo sete, principalmente a grande divergência em relação ao coelho, que nessa posição apresenta deleção/inserção de dois aminoácidos. Ocorrem dois alças em sua estrutura, $N_{289}-P_{292}$, e a G_{296} . É importante destacar que o spot 10C, que a primeira alça está completa, se mostrou mais reativo.

Uma diferença em relação ao epítomo sete é que sua seqüência é mais conservada, sendo que maioria dos aminoácidos presentes é idêntica nos seis isotipos da IgG. Por esse motivo, provavelmente os anticorpos contra esse epítomo deverão reconhecer todos os isotipos da IgG.

O resultado mais surpreendente foi o epítopo doze. Esse epítopo demonstrou reatividade média, e não foi previsto por nenhum dos três programas. Esse epítopo tem uma alça, entre os resíduos H₃₃₆-V₃₄₃, e o spot 19C, onde essa alça está completa, apresentou maior D.O.

O alinhamento demonstra que a principal diferença entre o coelho e o cavalo nesse epítopo são os resíduos V₃₄₃ M₃₄₄. Esses aminoácidos são hidrofóbicos pelas escalas de Kyte-Doolittle e Parker. Talvez por esse motivo esse epítopo não tenha sido previsto pelos programas de predição a partir de estrutura primária.

Apesar da importância de seqüências polares para a formação do complexo antígeno-anticorpo, os resíduos apolares individualmente também pode ser importantes para a formação do complexo. No primeiro trabalho de spot síntese, por exemplo, foi demonstrado por *scan* de alanina a importância de resíduos de leucina para um epítopo presente numa proteína do citomegalovírus (FRANK, 1992).

Outra característica importante desse epítopo é que o isotipo IgG3 é o único que possui a seqüência V₃₄₃M₃₄₄. Provavelmente os anticorpos contra esse epítopo serão bastante específicos para esse isotipo.

Devido a maior reatividade o epítopo sete foi selecionado para a validação utilizando o método de Elisa. A medida da inibição em solução demonstrou novamente a importância do epítopo sete para o reconhecimento do soro policlonal.

A próxima etapa do trabalho foi a conjugação do epítopo sete ao TT, que funcionou como proteína carreadora. Para essa conjugação foi utilizada a técnica da ativação por EDC/NHS. A ativação ocorreu de forma satisfatória e segundo os resultados do espectrofotômetro.

A caracterização do conjugado formado por CLAE demonstrou que a reação de conjugação tinha ocorrido de pelo menos duas formas distintas, não apenas pelo N terminal do peptídeo.

Os coelhos apresentaram após a terceira imunização um título elevado contra a IgG eqüina. Os valores de título podem ainda ser aumentados, purificando-se os soros por cromatografia de afinidade com proteína A de *Staphylococcus aureus* (para concentrar a IgG) e por cromatografia de afinidade com anticorpos eqüino ou o peptídeo imobilizado na fase estacionária (para concentrar a IgG com alta afinidade pelo epítopo).

Com a obtenção desse soro a principal limitação para o desenvolvimento de um método imunológico para a detecção de IgG eqüina na presença de F(ab')₂ foi resolvida. Esse soro pode ser utilizado no desenvolvimento de um método de imunocromatografia.

Recentemente foram desenvolvidos vários sistemas analíticos de imunocromatografia ou cromatografia de imunoafinidade, tanto para controle de qualidade como para diagnósticos clínicos (PAEK, 2000). Essa técnica se baseia no uso de membranas poliméricas nas quais é ligado um antígeno ou anticorpo (reagente de captura) que reconhece especificamente o analito que se deseja determinar.

Esse soro pode ser marcado com um corante ou ouro coloidal (PAEK, 2000). Na membrana pode ser imobilizado o soro policlonal comercial de coelho anti IgG de cavalo. Quando a mistura for aplicada na membrana apenas haverá o desenvolvimento de cor se o soro antiofídico tiver resíduos de IgG.

O desenvolvimento de um teste rápido baseado em imunoafinidade é complexo, mais uma vez estabelecido, sua execução é rápida. Em minutos poderia ser determinada a presença de IgG em amostras de soros, o que facilitaria inclusive o controle em processo da hidrólise por pepsina.

Além disso, o domínio da tecnologia de desenvolvimento desses testes é interessante, pois seu uso em diagnóstico de doenças humanas (NILSSON, 1995) e em animais, e na determinação de contaminantes, como micotoxinas (DHAR, 2004), bactérias (PAEK, 1999) e microcistinas (PYO, 2006), tem crescido muito.

Algumas outras aplicações para esse soro também podem ser desenvolvidas.

O preparo de uma resina de cromatografia de afinidade para a purificação da IgG(T) eqüina é um exemplo. As condições de ligação dessa imunoglobulina a proteína A de *Staphylococcus* não são usuais, necessitando de resfriamento (MOTA, 1991) ou de gradientes de pH (SUGIARA, 2000). Além disso, a separação da IgG(a) não é completa.

A imobilização dessas imunoglobulinas em uma resina poderia ser uma alternativa para a separação da IgG(T) de plasma hiperimune, utilizando condições menos drásticas para a purificação dessa imunoglobulina.

Esse material pode também ser aplicado no diagnóstico de doenças de cavalos. Um teste importante para a saúde desses animais é o

acompanhamento da transferência de IgG do leite da égua para o potro (McGUIRE, 1977). Se essa transferência não acontece de forma adequada, o filhote pode desenvolver infecções e morrer. Por esse motivo, testes comerciais já são disponíveis para a medida dessa transferência (CLARK, 1999). Esse soro poderia ser utilizado como um reativo para o desenvolvimento de um kit alternativo para a determinação da transferência de IgGs entre a égua e o potro.

6 – Conclusões

Os resultados da identificação dos contaminantes possibilitaram a uma interpretação mais precisa do SDS-PAGE e mostraram as deficiências do processo de purificação dos soros antiofídicos usados no Brasil.

A hidrólise por pepsina, que deveria converter a IgG em $F(ab')_2$, não foi completa em um grande número de lotes. Esse tratamento também ajudaria a remover a albumina que co-precipitou com a IgG. A albumina residual é parcialmente hidrolisada, formando um artefato que mantém o peso molecular devido as pontes de sulfeto que essa molécula apresenta. Esse artefato mantém parte dos determinantes antigênicos necessários para o reconhecimento da ESA por IgE humana, apresentando dessa forma risco para pacientes alérgicos.

As duas etapas de precipitação por SA não removem de forma satisfatória os produtos de hidrólise parcial da albumina. Na segunda precipitação, que deveria separar o $F(ab')_2$ de F_c e da pepsina, também precipita a IgG, a albumina e seus produtos de proteólise parcial.

Na etapa de hidrólise por pepsina também ocorre a hidrólise parcial da região variável das IgGs. Esses produtos provavelmente têm uma capacidade de neutralização do veneno muito menor, contribuindo mais para os efeitos adversos que para os efeitos terapêuticos.

Esses resultados demonstram a necessidade de modernização do processo de purificação dos soros antiofídicos no Brasil. As linhas gerais do processo baseado na precipitação por SA foram estabelecidas nas décadas de trinta e quarenta do século XX, e os níveis de purificação alcançados em cada etapa deveriam ser mais bem avaliados, para a continuação do processo de purificação.

A comparação entre os resultados de pureza dos três principais fabricantes nacionais demonstrou que o produtor C tem um processo de purificação mais eficiente que os demais. A maior eficiência pode ser demonstrada pelos seguintes resultados:

- O teor médio de proteínas é o menor dos três fabricantes.
- O teor de $F(ab')_2$ é o maior dos três fabricantes, indicando o melhor processo de separação do $F(ab')_2$ dos demais componentes
- O desvio padrão entre os teores de $F(ab')_2$ é o menor dos três fabricantes, demonstrando uma melhor consistência de produção.
- Embora o teor de IgG não seja o menor, esse contaminante ocorre em um número menor de lotes (12,5 % dos lotes analisados), demonstrando um maior controle da etapa de hidrólise.
- O teor de ESA residual é o menor dos três produtores.

A avaliação dos resultados entre os produtores A e B demonstra que o primeiro apresenta um processo de purificação que melhor que o segundo. De um modo geral, em todos os parâmetros avaliados esse produtor teve um desempenho melhor que B.

Esses resultados apontam para a necessidade de uma revisão da legislação vigente no Brasil. Essa revisão deveria focar vários aspectos da produção e controle dos soros antiofídicos.

Deveriam ser estabelecimento de critérios de pureza para o produto final. Esses critérios deveriam contemplar o teor mínimo para o fragmento $F(ab')_2$, máximo de IgG e de ESA.

A implementação de um novo parâmetro voltado a avaliação da pureza demandaria também tempo e investimentos nos laboratório produtores. O investimento total do PNI nos laboratório produtores nacionais já superou US\$ 100 milhões, enquanto que o gasto anual com compra de imunobiológicos supera R\$ 850 milhões. Uma parcela pequena dos recursos destinada a aquisição poderia ser repassada aos produtores, para melhorarem particularmente seus procedimentos de purificação. É claro que qualquer programa de investimento deverá ser acompanhado da adoção de um

mecanismo de controle gerencial que permita a verificação quantitativa dos resultados alcançados.

Não considerar a necessidade desses investimentos, pois os efeitos adversos dos soros antiofídicos podem ser controlados com o uso de medicamentos, não parece uma solução justa. Esse tipo de raciocínio considera que o usuário do soro não precisa de um produto de melhor qualidade.

Soros antiofídicos são considerados drogas negligenciadas, logo todo o investimento na melhora de sua qualidade é significativo. Os argumentos econômicos também justificam esse investimento. Hoje é notório o sucesso do Brasil na produção de commodities agrícolas e minerais. Os trabalhadores envolvidos nessas atividades estão entre os grupos mais expostos a acidentes ofídicos. Desconsiderar a necessidade de investimentos em prol da qualidade desses produtos seria ignorar a importância econômica dessas atividades.

Os três principais produtores nacionais apresentam diferenças substanciais em relação à purificação dos seus produtos. Um dos produtores se aproxima dos parâmetros de pureza europeus, sendo que os demais estão mais longe de apresentar tais padrões.

O fato de um dos laboratórios produtores ter se aproximado de um nível de qualidade internacional não significa que os investimentos deveriam ser centrados nesse fabricante. A crise de desabastecimento da década de oitenta demonstrou que monopólios são prejudiciais ao sistema, e qualquer evento imponderável, como um acidente ou incêndio, poderia iniciar uma nova crise de desabastecimento.

Outra razão para o investimento em todos os laboratórios é a importância do conhecimento sobre os ofídios. Esses animais devem ser considerados da mesma maneira que as plantas medicinais, ou seja, um patrimônio da biodiversidade nacional. O captopril e da Batroxobina demonstraram o potencial de desenvolvimento de medicamentos a partir de seus venenos. Os institutos que produzem o soro antiofídico são as instituições que melhor detém o conhecimento sobre o manejo e reprodução desses animais, e a principal razão da existência desses institutos é a produção do soro.

As conclusões específicas alcançadas por esse trabalho são:

- O teor de proteínas e do teor de $F(ab')_2$ entre os diferentes lotes de mesmo produtor variam bastante, demonstrando a necessidade de melhoria dos processos, com conseqüente aumento da consistência de produção.
- A IgG foi identificada como um contaminante presente em vários lotes. Esse resultado demonstra que há a necessidade de maior controle para a etapa de hidrólise por pepsina.
- Foi identificada a soro albumina de asno, indicando que os fabricantes utilizam esses animais ou híbridos com cavalos na produção dos soros.
- Os resultados das análises permitiram identificar produtos de proteólise parcial da ESA pela pepsina, sendo duas porções da molécula são resistentes a hidrólise nas condições de processamento dos soros antiofídicos. Essas duas porções mantém parte dos determinantes antigênicos para o reconhecimento de IgE humana, contribuindo para o potencial alergênico dos produtos.
- Ocorre também proteólise da região V_H das imunoglobulinas, durante o processamento dos soros. Essa proteólise explica a queda de título dos soros observada por outros autores, após tratamento prolongado por pepsina.
- O mapeamento de epítomos lineares do isotipo IgG3 eqüino demonstrou a presença 12 epítomos diferentes. A maioria desses epítomos havia sido prevista com sucesso utilizando métodos computacionais.
- Um epítomo apresentou alta reatividade e dois epítomos apresentaram média reatividade frente a um soro policlonal. Os demais epítomos tiveram baixa reatividade frente a esse soro. Os três epítomos mais reativos encontram-se na porção F_c da IgG eqüina.
- Um peptídeo sintético com a seqüência do epítomo de maior reatividade conseguiu inibir aproximadamente 19% da resposta do soro policlonal num ensaio de Elisa.
- O peptídeo sintético com a seqüência do epítomo de maior reatividade foi conjugado com sucesso ao toxóide tetânico utilizando a técnica da EDC.

- Coelhos imunizados com esse conjugado desenvolveram títulos elevados de anticorpos contra imunoglobulinas eqüinas, demonstrando que o conjugado preparado conseguiu ativar a imunidade dos coelhos.
- Esse soro tem um potencial de uso na determinação da presença de IgG intacta nos soros antiofídicos, podendo também ser utilizado no controle em processo para acompanhar a hidrólise pela pepsina.
- Os resultados do trabalho indicam também que a legislação Brasileira deveria ser atualizada. É necessário incluir métodos e parâmetros para a avaliação do teor mínimo do fragmento $F(ab')_2$ nos soros antiofídicos, limites para a presença de IgG e de albumina e o estabelecimento de controles em processo para as etapas de purificação.
- A revisão da legislação assim como a sua implementação deveria ser acompanhada de um programa de investimentos nos fabricantes nacionais, para a melhora dos processos de purificação, e conseqüente melhora da qualidade dos produtos.

7 – Bibliografia

ABD-ELSALAM, M.A. et al. Preparation of a novel antivenom against *Atractaspis* and *Walterinnesia* venoms. **Toxicon**, vol. 49, n 1, p 8-18, 2007;

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. **Toxicon**, vol. 32, n. 6, p. 713-723, 1994;

ALENCASTRO, R.B.; FILHO, O.A.S. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, vol. 26, n. 2, p. 253-259, 2003;

ALMAGRO, J.C. et al. Analysis of horse V_H repertoire and comparison with the human IGHV germline genes, and sheep, cattle and pig V_H sequences. **Molecular Immunology**, vol. 43, p. 1836-1845, 2006;

BAGGERMAN, G. et al. Peptidomics. **Journal of Chromatography B**, vol. 803, p. 3-16, 2004;

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Biology in Biotechnology**, vol. 10, p. 411-421, 1999;

BANKUS, J.M.; BOND, J.S. Some commercially available proteases. Em **Proteolytic Enzymes**. Editores BEYNON, R; BOND, J.S. Second Edition, Oxford University Press, 2001, p. 295-330.

BENSADOUN, A.; WEINSTEIN, D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. **Analytical Biochemistry**, vol. 70, p. 241-250, 1976;

BERMUDEZ, J.A.Z. **Remédios: Saúde ou indústria? A produção de medicamentos no Brasil**. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 1992. 122p.

BEUVERY, E.C. et al. Physicochemical and immunological characterization of meningococcal group A polysaccharide-tetanus toxoid conjugates prepared by two methods. **Vaccine**, vol. 1, p.31-36, Dec. 1983;

BEUVERY, E.C. et al. Analytical, toxicological and immunological consequences of the use of N-ethyl-N`-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide as coupling reagent for the preparation of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate as vaccine for human use. **Developments in Biological Standardization**, vol. 63, p. 117-128, 1986;

BOCHNER, R. **Acidentes por animais peçonhentos: aspectos históricos epidemiológicos, ambientais e sócio-econômicos**. Rio de Janeiro; s.n; 2003. 128 p. mapas tab Graf. Doutorado – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2003a;

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 19, n. 1, p. 7-16, 2003b;

BOTROS, H. G. et al. Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens. **European Journal of Biochemistry.**, vol. 268, p. 3126-3136, 2001;

BRASIL. Resolução Normativa nº 10, de 6 de dezembro de 1978. Estabelece as normas técnicas básicas relacionadas com a prescrição, produção e emprego dos medicamentos, bem como anexadas as relações correspondentes, que têm o caráter dinâmico, sujeitas à atualização periódica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 26 jun. 2008;

BRASIL. Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. DOU 12/11/1996. Página 23491-23556;

BRASIL. Resolução-RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Estabelece as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em 28 mar. 2008;

BRASIL. Resolução-RDC nº 315, de 26 de outubro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de registro, alterações pós-registro e revalidação de registro dos produtos biológicos terminados. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 26 jun. 2008;

BRASIL. Suplemento 10 de janeiro de 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.37-52;

BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília,. Funasa. Ministério da Saúde. P. 9-35; 2001;

BRASIL.. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-vacinação**. Brasília, DF, 2ª edição Ministério da Saúde, p. 138, 2008;

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Distribuição e utilização de soros antiofídicos no Brasil, 2001 a 2003. 5p. Disponível:

BRUUN, L. et al. Effect of different hapten-carrier conjugation ratios and molecular orientations on antibody affinity against a peptide antigen. **Journal of Immunological Methods**, vol. 311, p. 198-206, 2006;

BUENO, S.M.A.; et al. Endotoxin removal from solutions of F(ab')₂ fragments of equine antibodies against snake venoms using macroporous chitosan membrane. **Journal of Membrane Sciences**, vol. 234, p. 67-73, 2004.

BURNOUF, T. et al. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. **Biologicals**, vol. 32, p. 115-128, 2004;

CARTER, D.C. et al. X-ray and primary structure of horse serum albumin (*Equus caballus*) at 0.27-nm resolution. **European Journal of Biochemistry**, vol. 215, p. 205-212, 1993;

CHERONI, A.P. Producción de suero antiofídico en Uruguay. **Revista Médica de Uruguay**, vol. 10, n. 3, p. 147-154, 1994;

CHOU, P. Y., FASMAN, G.D. Conformational parameters for amino acids in helical, b-sheet, and random coil regions calculated from proteins. **Biochemistry**, vol. 13, n. 2, p. 211-222, 1974;

CLARK, S. M. Reversible flow chromatographic Binding assay. **United States Patent n. 6.007.999**, 1999;

COOPER, J. B. et al. X ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism of aspartic proteinases. **European Biophysics Journal**, v. 35, p. 559-566, 2006;

COTTER, R. J. **Time-of-flight mass spectrometry**: Instrumentation and applications in biological research. Washington. American Chemical Society, 1997. 326p. il. (ACS Professional Reference Books);

COTTER, R. J., GRIFFITH, W., JELINEK, C. Tandem time of flight (TOF/TOF) mass spectrometry and the curved-field reflectron. **Journal of Chromatography B**, vol. 855, p. 2-13, 2007;

CREGG, J. M., CEREGHINO, J.L. Heterologous protein expression in the methylotropic yeast *Pichia Pastoris* **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000;

DANDEU, J. -P. et al. Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies. **Immunology**, vol. 88, p. 340-347, 1996;

DART, R.C. et al. Affinity-purified, mixed monospecific crotalid antivenom ovine Fab for the treatment of crotalid venom poisoning. **Annals of Emergency Medicine**, vol. 30, n. 1, p. 33-39, 1997;

DART, R.C.; McNALLY, J. Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. **Annals of Emergency Medicine**, vol. 37, n. 2, p. 181-188, Feb. 2001;

DART, R.C.; HILL, R.E.; BOGDAN, G.M. Time to reconstitution: purified Fab antivenom vs. unpurified IgG antivenom. **Toxicon**, vol. 39, p. 729-731, 2001;

DEMOLY, P. et al. Anaphylaxis to antitetanus toxoid serum. **Allergy**, vol. 57, p.860-861, 2002;

DENNIS, E. A., SIX, D.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1488, p. 1-19, 2000.

DE SIMONE SG et al. Purification and partial characterization of thrombin like Gyroxin enzyme from Bush master (*Lachesis Muta Rhombeata*) venom. **Toxicon**, v. 34, n. 05, p. 555-565, 1996;

DE SIMONE SG et al. *Bothrops moojeni* venom peptides containing bradykinin potentiating peptide sequence. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 01, p. 21-26, 2001;

DE-SIMONE, S.G.; JÚNIOR, F.P.S. Netto, C.C. Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins **Journal of Chromatography B**, 838, 135-138, vol. 12, p. 3755, 2006

DE-SIMONE, S.G.; et al., BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of *N*-glycosylation in thermostability and active site accessibility **Toxicon**, vol. 50, p. 18-31, 2007;

DHAR, T.K. e Pal, A. An analytical device for on-site immunoassay. Demonstration of its applicability in semiquantitative detection of aflatoxin B₁ in a batch of samples with ultrahigh sensitivity. **Analytical Chemistry**, vol. 76, p. 98-104, 2004;

DIAS, W. O. et al. Chromatografic purification of antivenoms and antitoxins. **Memórias do Instituto Butantan**, vol. 51, n. 4, p. 195-203, 1989;

DULLEY, J.R.; GRIEVE, P.A. A simple technique for eliminating interference by detergents in the lowry method of protein determination. **Analytical Biochemistry**, vol. 64, p. 136-141, 1975;

EICHACKER, L.A.; GRANVOGL, B.; PLÖSCHER, M. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, vol. 389, p. 991-1002, 2007;

EMINI, E.A. et al. Induction of hepatitis A vírus-neutralizing antibody by a vírus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, vol. 55, n. 3, p.836-839, 1985;

EUROPEAN Pharmacopoeia, V Edition. Immunosera for Human Use, Animal. 2938-2940.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICAL PRODUCTS. EVALUATION OF MEDICINES FOR HUMAN USE. Committee for proprietary medicinal products (CPMP). P. 1-14, 2002. London, 24 de July. CPMP/BWP/3354/99. Note for guidance on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use.

FAN, W.H. et al. Sequential randomized and double blind trial of Promethazine prophylaxis against early anaphylactic reactions to antivenom for Bothrops snake bites **British Medical Journal**, vol. 318, p. 1451-1453, 1997;

FAN, W.H. et al. Influência das alterações ambientais Na epidemiologia dos acidentes ofídicos e na distribuição geográfica das serpentes de importância médica nos estados de São Paulo e Paraná, 1988-1997. **Informe epidemiológico do SUS**, vol. 11, n. 1, p. 45-47, 2002;

FERNANDES, I. et al. Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, 38 (2000), 633-644;

FLOWER, D.R.; DAVIES, M.N. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. **Drug Discover Today**, vol. 12, n. 9/10, p. 389-395, May 2007;

FOX, J.W. et al. cDNA sequences for four snake metalloproteinases: Structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 308, n. 1, p. 182-191, 1994;

FRANK, R. Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on membrane support. **Tetrahedron**, vol. 46, n. 42, p. 9217-9232, 1992;

FRANK, R. The SPOT-synthesis technique synthetic peptide arrays on membrane supports – principles and applications. **Journal of Immunological Methods**, vol. 267, p. 13-26, 2002;

GEMAL, A.L.; LEAL, E.C. Controle de Qualidade dos Imunobiológicos: Participação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Em BUSS, P.M.; TEMPORÃO, J.G.; CARVALHEIRO, J.R. **Vacinas, soros & imunizações no Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005, p.131-144.

GEYER, R.; LOCHNIT, G. Carbohydrate structure analysis of batroxobin a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. **European Journal of Biochemistry**, vol. 228, p. 805-816, 1995;

GIBSON, D M. Structural Studies on Normal Horse Immunoglobulin Light Chains. Detection of κ -Type N-Terminal Sequences. **Biochemistry**, vol. 13, n. 13, p. 2776-85, 1974;

GIBSON, D. M. HOME, W.A., FORD, J.E. L Chain Isotype regulation in Horse. Characterization of Ig λ genes. **The Journal of Immunology**, vol. 149, n. 12, p. 3927-3936; 1992;

GIBSON, D. M. HOME, W.A., FORD, J.E. Immunoglobulin Light Chain Isotype regulation in the Horse. Characterization of Ig κ genes. **The Journal of Immunology**, vol. 153, p. 1099-1111; 1994;

GIDDINGS, M.C. et al. High-accuracy peptide mass fingerprinting using peak intensity data with machine learning. **Journal of Proteome Research**, vol. 7, n. 1, p. 62-69, 2008;

GIGLIO, O.A.B. et al. Alkylation of myotoxic phospholipases A_2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 36, p. 258-270, 2004;

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Analytical Biochemistry**, vol. 185, p. 131-135, 1990;

GREENBAUM, J.A. et al. Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. **Journal of Molecular Recognition**. Vol. 20, n.2, p. 75-82, 2007;

GU, X. X.; HOU, Y. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. **The Journal Immunology**, p. 4373-4379, 2003;

GUIDOLIN, R. et al. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botropicos e crotálico tratados por glutaraldeido. **Memórias do Instituto Butantan**, vol. 51, n. 3, p. 85-90, 1989

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Effect of storage temperature on the stability of the liquid polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, vol. 28, n. 1, p. 101-105, 1990;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of Newborn *Crotalus Durissus Durissus* and adult *Crotalus Durissus Terrificus* rattlesnakes. **Toxicon**, vol. 29, n.10, p. 1273-1277, 1991;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Turbidity of hyperimmune equine antivenom: The role of phenol and serum lipoproteins. **Toxicon**, vol. 31, n. 1, p. 61-66, 1993;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. **Toxicon**, vol. 32, n. 3, p. 351-363, 1994;

GUTIÉRREZ, J.M.; ANGULO, Y.; ESTRADA, R. Clinical and Laboratory Alterations in Horses during Immunization with Snake Venoms for the Production of Polyvalent (Crotalinae) Antivenom. **Toxicon**, vol. 35, N. 1, pp. 81-90, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis Muta* (Bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon**, vol. 36, n. 12, p. 2021-2027, 1998;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Comparative study on the ability of IgG and F(ab')₂ antivenoms to neutralize lethal and myotoxic effects induced by *Micrurus Nigrocinctus* (coral snake) venom. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** , vol. 61, n. 2, p. 266-271, 1999;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites in Colombia: Correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. **Toxicon**, vol. 37, p. 895-908, 1999;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Comparison between IgG and F(ab')₂ polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. **Toxicon**, vol. 39, p. 793-801, 2001;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in Snakebite Envenomation. **Biologicals**, vol. 30, p. 143-151, 2002;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: Comparison between horse, sheep and camel IgGs. **Toxicon**, vol. 46, p. 775-781, 2005;

GUTIÉRREZ, J.M.; LEON, G.; LOMONTE, B. Anticomplementary activity of equine whole IgG antivenoms: Comparison of three fractionation protocols. **Toxicon**, vol. 45, p. 123-128, 2005;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Pharmacokinetics of whole IgG equine antivenom: comparison between normal and envenomed rabbits. **Toxicon**, vol. 48, p. 255-263, 2006;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Strengthening antivenoms production in central and south american public laboratories: Report of a workshop. **Toxicon**, vol. 49, p. 30-35, 2007;

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Anti-human erythrocyte antibodies in horse-derived antivenoms used in the treatment of snakebite envenomations **Biologicals**, vol. 35, p. 7-11, 2007

HABER, E.; STONE, M. Extensive degradation of antibody by pepsin. **Biochemistry**, vol. 6, n. 7 p. 1974-1980, Jul. 1967;

HAGER-BRAUN e TOMER, K.B. Determination of Protein-derived epitopes by Mass Spectrometry. **Expert Review in Proteomics**, vol. 2, n. 5, p. 745-756, 2005;

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

HELMS, C. M.; ALLEN, P.Z. Studies on Equine Immunoglobulins. II. Antigenic Interrelationships among Horse IgG, IgG(T) and Antipneumococcal γ_1 -Components. **The Journal of Immunology**, vol. 105, n. 5, p. 1253-1263, 1970;

HELLMAN, U. et al. Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Analytical Biochemistry**, vol. 224, p. 451-455, 1995;

HIGASHI, H.G. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. **Memórias do Instituto Butantan**, vol. 51, n. 3, p.107-115, 1989;

HIGASHI, H.G. et al Processo de obtenção de soro eqüino anti-laquétrico O qual utiliza, como antígeno, o veneno da serpente *Lachesis muta* depletado de uma fração supressora. **Patente número I0502080-8**, 2007;

HOARE, D.G.; KOSHLAND, D.E. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid group in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 242, n. 10, p.2447-2453, 1967;

HOLMES, M.A.; SHEORAN, A.S. Separation of equine IgG subclasses (IgGa, IgGb and IgG(T)) using their differential binding characteristics for staphylococcal protein A and streptococcal protein G. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 55, p. 33-43, 1996;

HOLMES, M.A.; SHEORAN, A.S.; LUNN, D.P. Monoclonal antibodies to subclass-specific antigenic determinants on equine immunoglobulin gamma chains and their characterization. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 62, p. 153-165, 1998;

HUM, W.T., LEE, S.G. Method for Isolation of Antigen Specific Immunoglobulin. **United States Patent 4.806.346**, 1989;

ICHIHARA Y., SOGAWA K., TAKAHASHI K.; Isolation of human, swine, and rat prepepsinogens and calf preprochymosin, and determination of the primary structures of their NH₂-terminal signal sequences. **Journal of Biochemistry**, vol. 98, n. 2, p. 483-492, 1985.

JOHANSSON, M.A., HELLENÄS, K.E. Matrix effects in immunobiosensor determination of clenbuterol in urine and serum. **The Analyst**, v. 129, p. 438-442, 2004;

JONES, R.G.A.; LANDON, J. Enhanced pepsin digestion: A novel process for purifying antibody F(ab')₂ fragments in high yield from serum. **Journal of Immunological Methods**, vol. 263, p. 57-74, 2002;

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 43, n. 1, p. 74-76, 1997.

JUNGBLUT, P.R. et al. Peptide Mass Fingerprinting. **Methods**, vol. 35, p. 237-247, 2005;

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser Desorption Ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. **Analytical Chemistry**, vol. 60, n. 20, p. 2299-2301, Oct. 1988;

KARPLUS, P.A.; SCHULZ, G.E. Prediction of chain flexibility in proteins – A tool for selection of peptide antigens. **Naturwissenschaften**, vol. 72, p. 212-213, 1985;

KLINMAN, N. et al. Equine anti-hapten antibody. III. The comparative properties of γ G- and γ A-antibodies. **The Journal of Immunology**, vol. 96, n. 4, p. 587-595, 1966;

KLUBER-KIELB, J.; et al Additional Conjugation Methods and Immunogenicity of *Bacillus anthracis* Poly- γ -D-Glutamic Acid-Protein Conjugates. **Infection and Immunity**, vol. 74, n. 8, p. 4744-4749, 2006;

KNIGHT, K.L.; BURNETT, R.C.; McNICHOLAS, J.M. Organization and polymorphism of rabbit immunoglobulin heavy chain genes. **The Journal of Immunology**, vol. 134, p. 1245-1250, 1985;

KOLASKAR, A.S.; TONGAONKAR, P.C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS**, vol. 276, n. 1,2, p. 172-174, Dec. 1990;

KOLASKAR, A.S.; KULKARNI-KALE, U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. **Virology**, vol. 261, p. 31-42, 1999;

KRICKA, L.J. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. **Clinical Chemistry**, vol. 45, n. 7, p. 942-956, 1999;

KRIFI, M. N.; AYEB, M. EL; DELLAGI; K. The improvement and standartization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency and cost. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, vol.5, n.2, 1999.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hidropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, vol. 157, p. 105-132, 1982.

LALLOO, D.G.; THEAKSTON, R.D.G. Snake Antivenoms. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**, vol. 41, n. 3, p. 277-290, 2003;

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage **Nature**, vol. 227, 680-5 1970.

LANDON, J. et al. An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Vipera Berus* envenoming. **Toxicon**, vol. 30, n. 8, pp. 865-871, 1992;

LANG, J. et al. Clinical safety of a polyvalent F(ab')₂ equine antivenom in 223 African snake envenomations: A field trial in Cameroon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 92, p. 657-662, 1998;

LASKOWSKI R A, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, vol. 26, p. 283-291, 1993;

LAUNE, D. et al. Application of the spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **Journal of Immunological Methods**, vol. 267, p. 53-70, 2002.

LAZAR, A. et al. Inactivation of West-Nile Virus During Peptic Cleavage of Horse Plasma IgG. **Biologicals**, vol. 30, p. 163-165; 2002.

LEVITT, M. Conformational preferences of amino acids in globular proteins. **Biochemistry**, vol. 17, n 20, p 4277-4285, 1978.

LI, WEI et al. NHS-mediated QDs-peptide/protein conjugation and its application for cel labeling. **Talanta**, vol. 75, p. 1008-1014, 2008.

LIMA, F.A.F. **Dessorção induzida por laser em insulina, carbono e haletos alcalinos**. Rio de Janeiro: PUC, 2006. p114. il. Doutorado – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Física.

LOMONTE, B. et al. Immunoglobulin G and F(ab')₂ Polyvalent Antivenoms do not Differ in their Ability to Neutralize Hemorrhage, Edema and Myonecrosis Induced by *Bothrops Asper* (Terciopelo) Snake Venom. **Toxicon**, vol. 35, n.11, 1627-1637; 1997.

LOMONTE, B.; YAMILETH, A.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, vol. 42, p. 885-901, 2003.

LUCAS, H. et al. Induction of opsonic antibodies to the γ -D-glutamic acid capsule of *Bacillus anthracis* by immunization with a synthetic peptide-carrier protein conjugate. **Immunology and Medical Microbiology**, vol. 40, p. 231-237, 2004;

LUND, O.; LARSEN, J.E.P.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, vol. 2, n 2, abril de 2006.

LUND, O.; ANDERSEN, P.H.; NIELSEN, M. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, vol. 15, p. 2558-2567, Oct. 2006. Disponível em: <http://www.proteinscience.org>. Acesso em: 17 abr. 2008;

LÜTHY R, BOWIE JU, EISENBERG D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, vol. 356, n. 6364, p. 83-85, 1992.

MANN, M. et al. Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix made by fast evaporation. **Analytical Chemistry**, vol 66, p. 3281-3287, 1994.

MASSALDI, H.; MORAIS, V. Economic Evaluation of snake antivenom production in the public system, **Journal Venomous Animals and Toxins Including. Tropical Disease**, vol. 12, n. 3, p. 497-511, 2006;

MAURER, G. et al. Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt concentration and pH. **Chemical engineering and Processing**, vol. 47, p. 1026-1033, 2008;

MAYER, B. et al. Analysis and prediction of protective continuous B-cell epitopes on pathogen protein. **Immunome Research**, vol. 4, n. 1, p. 1-17, 2008;

MELGAREJO, A.R. **Lachesis muta rhombeata: Da serpente à atividade biológica do veneno e suas implicações na saúde pública**. Niterói: UFF, 1998. 208p. il. Doutorado – Universidade Federal Fluminense, Hospital Universitário Antônio Pedro, Rio de Janeiro;

MELOEN, R.H. et al. Synthetic peptide vaccines: Unexpected fulfillment of Discarded Hope?. **Biologicals**, vol. 29, p. 233-236, 2001

MIRSKY, V.M.; WROBEL, N.; SCHINKINGER, M. A novel ultraviolet assay for testing side reactions of carbodiimides. **Analytical Biochemistry**, vol. 305, p. 135-138, 2002;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Coordenação de Vigilância de Doenças Transmitidas por Vetores e

Antropozoonoses. Distribuição e Utilização de Soros Antiofídicos no Brasil, 2001 a 2003. Disponível em www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdt/soros-brasil.pdt. Acesso em 18/03/2008;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Coordenação de Vigilância de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Histórico do Ofidismo. www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdt/historico-ofidismo.pdf. Acesso em 18/03/08;

MOLINA, F. et al. PEPOP: Computational design of immunogenic peptides. **BMC Bioinformatics**, vol. 9, n. 71, p. 1-15, 2008;

MONTGOMERY, D.C., CALADO, V. **Planejamento de experimentos usando o statistica** Editora e-papers, Rio de Janeiro, 2003 260;

MORAIS, V.; MASSALDI, H. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. **Toxicon**, vol. 46, p.876-882, Nov. 2005;

MORAN, N.F. et al. High Incidence of Early Anaphylactoid Reaction to SAIMR Polyvalent Snake Antivenom. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 92 (1998), 69-70;

MORHY, L. et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, vol. 40, p. 997-1006, 2002;

MOTA, I.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H.A. Isolation of horse IgG with protein A. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, vol. 24, p. 1129-1131, 1991;

NETTO, C.C. **Estudo imunoquímico do veneno de *Bothrops jararacussu*, Lacerda, 1884 e identificação de moléculas biomarcadoras como**

ferramentas para o desenvolvimento de diagnóstico. Rio de Janeiro Fiocruz,. 90p. II. Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2007;

NILSSON, S. et al. Thin-layer immunoaffinity chromatography with Bar code quantitation of C-reactive protein. **Analytical Chemistry** Vol. 67, p. 3051-3056, 1995;

NOCK, S; WILSON, D.S., WU, J. Methods for making antibody fragments and compositions resulting therefrom. **United States of America Patent 6.720.165**, 2004.

ORTEGUI, C.C et al Antibodies against synthetic epitopes inhibit the enzymatic activity of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, vol. 48, p. 1098-1103, 2006.

OWNBY, C. L. et al. Letter to Editor: The role of venom citrate. **Toxicon**, vol. 37, p. 407-409, 1999;

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, vol. 37, p. 411-445, 1999;

PAEK, S.-H. et al. Performance control strategies of one-step immunochromatographic assay system for Salmonella Typhimurium. **Analytical Letters**, vol. 32, n. 2, p. 335-360, 1999;

PAEK, S.-H. et al. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, vol. 22, p. 53-60, 2000;

PARKER, J.M.R, HODGES, R.S., GUO, D. New hidrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, vol. 25, p. 5425-5432, 1986;

PARKER, K.C. et al. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. **Electrophoresis**, vol. 19, p. 1920-1932, 1998;

PASCUAL, V. et al. Somatic Hypermutation introduces insertions and deletions into Immunoglobulin V genes. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 187, n. 1 p. 59-70, 1998;

PELLEQUER, J.L.; WESTHOF, E., VAN REGENMORTEL, M.H.V. Epitope predictions from the primary structure of proteins. Em **Peptide Antigens A practical Approach**. Editor WISDOM, G.B. First Edition, Oxford University Press, p. 7-23,1993.

PEPIN-COVATTA, J.-M. et al. Immunoreactivity of a New generation of horse F(ab')₂ preparations against European viper venoms and the tetanus toxin. **Toxicon**, vol. 35, n. 3, p. 411-422, 1997;

PÉREZ, J. C. et al. An Internet database of crotaline venom found in the United States. **Toxicon**, vol. 39, p. 621-632, 2001;

PONOMARENKO, J.V.; BOURNE, P.E. Antibody-protein interactions: Benchmark datasets and prediction tools evaluation. **BMC Structural Biology**, vol. 7, n. 64, 2007. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com>.

PONTE, C.F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciência, Saúde – Manguinhos**, vol. 10, supl. 2, p. 619-53, 2003;

POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. – True digestion of the proteins. **British Journal Experimental Pathology**, vol. 20, p. 132-49, 1939;

PUPKO, T. et al. Pepitope: Epitope mapping from affinity-selected peptides. **Bioinformatics Applications Note**, vol. 23, n. 23, p. 3244-3246, 2007;

PYO, D. et al. Rapid analytical detection of microcystins using gold colloidal immunochromatographic strip. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, vol. 27, p. 291-302, 2006;

QUEIROZ, W.J. **O processo produtivo do soro antiofídico: Da crise à superação?**. Goiânia: UCG, 2005.46p. il. Mestrado – Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Goiás;

QUIRION, R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids**, vol. 33, p. 405-414, 2007;

RAJU, T.S. et al. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. **Glycobiology**, vol. 10, n. 5, p. 477-486, 2000;

RAJU, T.S.; SCALLON, B. Fc glycans terminated with N-acetylglucosamine residues increase antibody resistance to papain. **Biotechnology Progress**, vol. 23, p. 964-971, 2007;

RATANABANANGKOON, K. et al. Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography **Journal of Chromatography B**, vol. 700, p. 233-39; 1997;

RATANABANANGKOON, K.; RAWEERITH, R. Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. **Journal of Immunological Methods**, vol. 282, p. 63-72; 2003;

RATANABANANGKOON, K.; RAWEERITH, R. Immunochemical and Biochemical Comparisons of Equine Monovalent and Polyvalent Snake Antivenoms. **Toxicon**, vol 45, p. 369-375, 2005;

RAW, I; HIGASHI, H.G.; MERCADANTE, O.A. Desenvolvimento e produção de vacinas e soros no Instituto Butantan, em BUSS, P.M.; TEMPORÃO, J.G.; CARVALHEIRO, J.R. **Vacinas, soros & imunizações no Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005, p. 337-348.

REDWAN, E.-R. M. Comparison between therapeutic antitoxin F(ab)₂ fractionated with ammonium sulfate and caprylic acid. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, vol. 27, p. 319-329, 2006;

REINECK, U et al. Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences **Journal of Immunological Methods**, vol. 267, p. 37-51, 2002;

RENART, J.; REISER, J.; STARK, G.R. Transfer of Proteins from gels to dizobenzoyloxymethyl paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**. Vol. 76, n. 6, p. 3116-3120, 1979;

ROCKEY, J.H. The subunits and fragment of anti- β -lactoside antibody. Equine Antihapten Antibody, **Journal of Experimental Medicine**, vol. 125, p. 249-275, 1967;

RODRIGUES-SIMIONI, L. et al. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, vol. 44, p. 259-271, 2004;

ROEPSTORFF, P. et al. Sample preparation methods for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides, proteins, and nucleic acids. **Cell Biology: A Laboratory Handbook**, Second Ed. New York: Academic Press, 1998. vol. 40, 556p;

ROGERO, J.R. E NASCIMENTO, N. Atenuação da toxicidade de venenos de ofídicos por meio de radiações ionizantes. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Vol.01, n. 02, p. 24-26, 1997;

RUSSEL, F.E. et al. Preparation of a new antivenin by affinity chromatography. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 34, n. 1, p. 141-150, 1985;

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

SANO-MARTINS, I.S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Quartely Journal of Medicine**, vol. 94, p. 551-559, 2001;

SANTORO, M.M. et al. Thermal stability studies of hyperimmune horse antivenoms. **Toxicon**, vol. 37, p. 33-45, 1999;

SANTOS, R.M.M. Contribuição da FUNED para a produção de soros antivenenos e antitóxicos no Brasil. **Revista Mineira de Saúde Pública**, A.5, n.6, p. 13-19, Jan/Jun. 2005;

SCHRAMM, W.; PAEK, S.-H.; VOSS, G. Strategies for the immobilization of antibodies. **Immunomethods**, vol. 3, p. 93-103, 1993;

SCHRENZEL, M.D. et al Characterization of horse (*Equus caballus*) mu chain immunoglobulin encoding gene **Immunogenetics**, vol. 45, p. 386-393, 1997;

SELLS, P.G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. **Toxicon**, vol. 42, p. 115-133, 2003;

SERRANO, S.M.T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, vol. 5, p. 501-510, 2006;

SIELECKI A.R., et al.; Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8-Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, vol. 219, p.671-692, 1991;

SILVA, A.M.M. et al. *Lachesis muta muta* venom: Immunological differences compares with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. **Toxicon**, vol. 39, p. 711-719, 2001;

SILVA, W.D. et al. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. **Toxicon**, vol. 27, n. 3, p. 297-303, 1989;

SILVA, W.D. et al. Snake antivenoms from hyperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. **Toxicon**, vol. 32, n. 6, p. 725-734, 1994;

SILVA, W.D.D. et al. Randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for bothrops snake bites in Uraba. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, vol. 58, n. 2, p. 183-189, 1998;

SIMPSON, R.J. In-Gel Proteolytic Digestion and Extraction of Peptides. **Proteins and Proteomics: Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. Página 400;

SKINNER, C.D.; BANDILLA, D. Capillary electrochromatography of peptides and Proteins. **Journal of Chromatography A**, vol. 1044, p. 113-129, 2004;

SLATER, N. K. H. et al Facile F(ab')₂ manufacturing: Strategies for the production of snake antivenoms. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 80, n C, p. 88-97, 2002.

SOARES, A.M. et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake

plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 302, p. 193-200, 2003;

SOUTHERN, J.A. et al; Identification of an epitope on the P-proteins and V-proteins of simian-virus 5 that distinguishes between 2 isolates with different biological characteristics **Journal of General Virology**, vol. 72, p. 1551-1557, n.7, 1991;

SUGIURA, T. et al. Production of monoclonal antibodies to six isotypes of horse immunoglobulin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 62, p. 145-151, 1998;

SUGIURA, T.; IMAGAWA, H.; KONDO, T. Purification of horse immunoglobulin isotypes based on differential elution properties of isotypes from protein A and protein G columns. **Journal of Chromatography B**, vol. 742, p. 327-334, 2000;

TAM, J. P. Immunization with peptide-carrier complexes: Traditional and multiple-antigen peptide systems. Em **Peptide Antigens A practical Approach**. Editor WISDOM, G.B. First Edition, Oxford University Press, p. 83-115,1993.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; Antivenoms: A List of Hyperimmune Sera Currently Available for the Treatment of Envenoming by Bites and Stings., **Toxicon**, vol. 29, n. 12, p. 1419-1470, 1991;

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Crisis in snake antivenom supply for Africa. **The Lancet**, vol. 356, p. 2104, Dec. 2000;

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, vol. 41, p. 541-557, 2003;

TRAVIS, J. et al. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. **Biochemistry Journal**, vol 157, p. 301-306, 1976.

TRIBBICK, G. Multipin peptide libraries for antibody and receptor epitope screening and characterization. **Journal of Immunological Methods**, vol. 267, p. 27-35, 2002;

VAN REGENMORTEL, M.H.V. From absolute to exquisite specificity. Reflections on the fuzzy nature of species, specificity and antigenic sites. **Journal of Immunological Methods**, vol. 216, p. 37-48, 1998;

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. **Biologicals**, vol. 29, p. 209-213, 2001;

VIJAY, I.K.; SEHGAL, D. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. **Analytical Biochemistry**, vol. 218, p. 87-91, 1994;

VOLKMER-ENGERT, R. et al. SPOT synthesis: Reliability of array-bases measurement of peptide binding affinity. **Analytical Biochemistry**, vol. 342, p. 300-311, 2005;

XINDU, G., Wang, L. Liquid Chromatography of recombinant proteins and proteins drugs. **Journal of Chromatography B**, vol. 866, p. 133-153, 2008

WAGNER, B. et al. Organization of the Equine Immunoglobulin Heavy Chain Constant Region Genes; III. Alignment of $c\mu$, $c\gamma$, $c\epsilon$ and $c\alpha$ Genes. **Immunobiology**, vol. 199, p. 105-119; 1998;

WAGNER, B. et al. Evolution of the six horse IGHG genes and corresponding immunoglobulin gamma heavy chains. **Immunogenetics**, vol. 54, p. 353-364, 2002;

WAGNER, B. et al. The complete map of the Ig heavy chain constant gene region reveals evidence for seven IgG isotypes and for IgD in the horse. **The Journal of Immunology**, vol. , p. 3230-3242, 2004;

WAGNER, B. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. **Developmental and Comparative Immunology**, vol. 30, p. 155-164, Jul. 2006;

WALKER, B. Solid Phase peptide Synthesis. Em **Peptide Antigens A practical Approach**. Editor WISDOM, G.B. First Edition, Oxford University Press, p. 27-81, 1993;

WALSH, G. **Biopharmaceuticals biochemistry and biotechnology**. 2 ed. London: Wiley & Sons, 2003. 135p. il.; (LIVRO)

WARRELL, D.A. et al. Prediction, prevention, and mechanism of early (Anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. **British Medical Journal**, vol. 292, p. 17-20, 1986;

WARRELL, D.A. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quarterly Journal of Medicine**, vol. 86, p. 315-325, 1993;

WEIR, R.C.; PORTER, R.R. The Antigen-Binding Capacity of the Peptide Chains of Horse Antibodies. **Biochem. J.**, vol. 100, p. 69-72, 1966a;

WEIR, R.C.; PORTER, R.R. Comparison of the structure of the immunoglobulins from horse serum. **Biochem. J.**, vol. 100, p. 63-68, 1966b;

WEIR, R.C.; PORTER, R.R.; GIVOL, D. Comparison of the C-terminal amino-acid sequence of two horse immunoglobulins IgG and IgG (T). **Nature**, vol.8, n. 5058, p. 205-206, 1966c;

WHO. **Rabies and envenomings: A neglected public health issue**: report of a consultative meeting. Geneva. 2007.

WILLIAMS, D.J. et al Antivenom use, premedication and early adverse reactions in the management of snakebites in rural Papua New Guine. **Toxicon**, vol. 49, p. 780-792, 2007.

WILSON, A.D. et al. Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in icelandic and non-icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 12, p. 156-170, 2006;

WINTER G., MILSTEIN C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of redefined specificity. **Nature**, vol. 256, p. 495–497, 1975;

WISDOM, G.B. Peptide antigens and anti-peptide antibodies. Em **Peptide Antigens A practical Approach**. Editor WISDOM, G.B. First Edition, Oxford University Press, p. 1-6,1993.

XIULAN, S. et al. Preparation of gold-Labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 99, p. 185-194, 2005;

ZHANG, W.; CHAIT, B. T. Profound: An expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. **Analytical Chemistry**, vol. 72, n. 11, p. 2482-2489, Jun. 2000;

ZINGALI, C.R.B. et al. Proteolytic action of *Bothrops Jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, vol. 39, p. 787-792, 2001;