

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**CLONAGEM E ANÁLISE MOLECULAR
DE cDNAs DO APARATO
PEÇONHENTO DO PEIXE-ESCORPIÃO
Scorpaena plumieri (Bloch, 1789)**

Fábio Lucas Silva Costa

Belo Horizonte
2014

Fábio Lucas Silva Costa

**CLONAGEM E ANÁLISE MOLECULAR
DE cDNAs DO APARATO
PEÇONHENTO DO PEIXE-ESCORPIÃO
Scorpaena plumieri (Bloch, 1789)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como exigência parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo

Belo Horizonte
2014

043

Costa, Fábio Lucas Silva.

Clonagem e análise molecular de cDNAs do aparato peçonhento do peixe-escorpião *scorpaena plumieri* (Bloch, 1789) [manuscrito] / Fábio Lucas Silva Costa. – 2014.

234 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Edmundo Salas Bravo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Peixe- escorpião - Teses. 2. Peçonhas. 3. Glândulas – Teses. 4. *Scorpaena plumieri* – Teses. 5. DNA complementar. 6. Lectinas. 7. Fator letal. 8. Bioquímica – Teses. I. Salas Bravo, Carlos Edmundo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1

Agradecimentos

A Deus e meus Santinhos que me protegem e estão sempre comigo.

A esta universidade, em especial ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, seu corpo docente, direção e administração.

Ao professor Dr. Carlos Edmundo Salas pela orientação criteriosa e atenciosa durante todas as fases de desenvolvimento desse projeto. Obrigado pela confiança depositada em mim para trabalhar no laboratório, por ter acompanhado os meus experimentos e progresso e, até mesmo ir ao laboratório nos finais de semana me ajudar, quando foi necessário.

À professora Dra. Maria Elena de Lima com quem tive um primeiro contato na UFMG e que me instigou cientificamente quando apresentou a ideia de desenvolver um projeto na área de Biologia Molecular utilizando como material biológico, o peixe-escorpião brasileiro.

À professora Dra. Suely G. Figueiredo pela doação dos espécimes de peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* e pela oferta dos antisoros produzidos a partir da imunização em coelhos com frações da peçonha. Obrigado também pelos incentivos prestados durante parte do desenvolvimento desse projeto.

Ao professor Dr. Evanguedes Kalapothakis por permitir que eu realizasse os sequenciamentos do DNA em seu laboratório e obrigado pela sua participação na qualificação do Doutorado e pelas ideias sugeridas para finalizar o projeto.

Ao professor Dr. Adriano M. C. Pimenta por permitir o uso do laboratório quando fosse conveniente.

Ao professor Dr. Miguel Ortega pelo uso de programas específicos de bioinformáticas.

Ao NAGE (Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica) e ao técnico Juliano Leal pela realização de parte dos sequenciamentos de DNA do projeto.

À técnica Luciana Siqueira, a quem devo imensamente, por preparar com muito carinho e responsabilidade todos os materiais que foram utilizados para a realização dos experimentos. Obrigado Lú, por cuidar muito bem do laboratório e me ajudar a livrar das nucleases. Tenho certeza que sem as suas contribuições dificilmente eu conseguiria finalizar esse projeto.

Aos alunos de Iniciação Científica: Joaquim, Shirlene, Ênio, Álvaro, Gisele, Tamara, Jéssica, Adriane, Júnior e Luz Alba. Um pouco de cada um de vocês existe nesse trabalho. Obrigado pela ajuda durante os experimentos e pela atenção em resolver os problemas de pesquisa.

Aos colegas e amigos do laboratório: Raquel, Tâmara, Isabela e Brisa. Obrigado pelo convívio de vocês, por me apresentarem e mostrarem como os experimentos básicos do laboratório são conduzidos. Obrigado também pela amizade, as companhias nos almoços e pelas nossas conversas.

À minha família a quem não poderei jamais deixar de agradecer.

Aos meus pais, a quem devo pedir desculpas pela minha ausência em casa durante esses anos. Agradeço pelo amor, por tudo aquilo que me ensinaram na vida, pela paciência e incentivo.

A todos os meus irmãos, em especial à Fabiana e Fernanda, que me apoiaram incondicionalmente. Obrigado irmãs, pelas ligações, pelas nossas conversas, por ouvirem minhas lamentações e angústias, pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço e, em especial, por me ajudarem a sentir mais perto de casa.

Aos meus sobrinhos que são uma continuidade de mim, nos momentos da minha presença, sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Meus agradecimentos aos meus amigos da época da graduação em Uberlândia, os quais são a família que me permitiram escolher.

Ao LVTA (Laboratório de Venenos e Toxinas Animais) e LVTanos, obrigado por sempre me tratarem muito bem no laboratório e por fazerem com que eu não me sentisse como um agregado.

À professora Dra. Miriam Paz Lopes responsável pelo LSAT (Laboratório de Substâncias Antitumorais) e a todos os LSATanos. Obrigado pessoal pela alegria contagiante de vocês, pelas nossas conversas, trocas de experiências e pela presteza em ajudar a resolver os problemas inerentes do laboratório.

Ao LMM (Laboratório de Marcadores Moleculares) e ao pessoal responsável pelo sequenciador de DNA (Flávia, Isabela, Bárbara e Anderson), meus agradecimentos pela ajuda no uso do equipamento e orientação no preparo das amostras.

Aos funcionários e laboratórios do Departamento de Bioquímica e Imunologia, os quais foram solícitos em ajudar sempre que precisei.

Meus agradecimentos ao pessoal da Manutenção de Equipamentos da universidade e os responsáveis pela limpeza geral dos laboratórios.

Ao INCTTOX (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

"Na Austrália, os aborígenes realizam um antigo ritual de dança para educar seus filhos. Relaciona-se com uma mensagem que é tão importante hoje como era há centenas de anos atrás. Ele começa com uma pantomima de um homem caminhando em praias de maré rasa à procura de um peixe. De repente, ele pisa em algo que lhe faz gritar de dor. O homem usa um modelo de argila de um peixe com 13 espinhos de madeira em suas costas. O dançarino se contorce no chão, em aparente agonia até o ritual finalmente sucumbir a uma canção de morte. O peixe representado na dança é o peixe-pedra, um membro da Ordem Scorpaeniformes. Dizem ser o peixe mais mortal do mundo".

Essa descrição foi publicada pelo National Aquarium in Baltimore's Department of Education em 1988.

Resumo

Peixes-escorpião, membros do gênero *Scorpaena* são conhecidos por serem peçonhentos com glândulas de peçonha formadas por espinhos. Envenenamento ocorre através da pressão mecânica dos espinhos, permitindo que a peçonha escape produzindo danos locais e sistêmicos nas vítimas. O presente trabalho descreve a caracterização de cDNAs obtidos do aparato peçonhento do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. Um total de 573 ESTs apropriadas para análises foram obtidas da biblioteca de bacteriófagos e foram categorizadas em diferentes grupos de acordo com suas funções biológicas. Análises com BLASTn identificaram 39 (7%) de ESTs formadas por sequências envolvidas na síntese de proteínas e processamento, 80 (14%) para o metabolismo, 46 (8%) para funções estruturais/motilidade, 103 (18%) envolvidas com a sinalização celular, 62 (11%) codificam para proteínas regulatórias, 81 (14%) de proteínas hipotéticas e 162 (28%) com funções desconhecidas. ESTs que codificam para lectinas-like foram altamente expressas e redundantes na biblioteca e totalizaram 69 (12%) de todos os transcritos. Baseado nos dados obtidos em experimentos de RT-PCR e clonagem de cDNAs, foram determinadas com sucesso as sequências de nucleotídeos que codificam para toxinas correspondentes às subunidades α e β . As sequências deduzidas de aminoácidos (702 resíduos cada subunidade) mostram homologia significativa com outras toxinas descritas em Scorpaeniformes e o alinhamento entre as subunidades α e β exibe uma identidade de 54% e similaridade de 76%. Como relatado nas toxinas de Scorpaeniformes, as subunidades do peixe-escorpião também contém o domínio B30.2/SPRY na região C-terminal. Sítios de potencial citolítico e peptídeos antimicrobianos foram identificados nas duas subunidades. A árvore filogenética foi gerada para as toxinas descritas em Scorpaeniformes e suporta a classificação taxonômica desses peixes. Esses dados indicam a presença de transcritos que mostram estruturas primárias similares a outras toxinas de peixes e com potencial para a produção de antiveneno contra o envenenamento de peixes-escorpião no Brasil.

Palavras-chave: Glândulas de peçonha, *Scorpaena plumieri*, peixes-escorpião, cDNAs, lectina, fator letal.

Abstract

Scorpionfish, members of the genera *Scorpaena* are known to be venomous, having venom glands tissues in ray-finned structures. Envenomation occurs through mechanical pressure on the spine, permitting the venom to escape producing a local and systemic damage in the prey. The present work describes the characterization of cDNAs obtained from *Scorpaena plumieri* venom apparatus. A total of 573 ESTs suitable for analysis were obtained from the bacteriophage library and categorized into different groups according to their biological functions. BLASTn analysis identified 39 (7%) for sequences involved in protein expression, 80 (14%) to metabolism, 46 (8%) to cell structure/motility, 103 (18%) to cell signaling/communication, 62 (11%) to regulatory genes, 81 (14%) to hypothetical proteins and 162 (28%) with unknown functions. The highly redundant message encoding for lectins-like proteins accounts for 69 (12%) of all transcripts obtained from *Scorpaena plumieri*. Based on the data obtained in RT-PCR and cDNA cloning, the nucleotide sequences encoding the α - and β -subunits toxin were successfully determined. The deduced amino acid sequence (702 amino acid residues each subunit) shows significant homology with toxins described in Scorpaeniformes. Sequence alignment between subunits displays an overall identity of 54% and a similarity of 76%. As reported for the Scorpaeniformes toxins, the subunits α and β toxin of the scorpionfish also contain a B30.2/SPRY domain in the C-terminal region. Potential sites for cytolytic and antimicrobial peptides were identified in both subunits. The phylogenetic tree generated for Scorpaeniformes toxins supports the classification of these fishes. These data indicate the presence of a putative toxin protein whose primary structure is alike other fish toxins and with potential for production of antivenom against scorpionfish envenomation in Brazil.

Keywords: Venom gland, *Scorpaena plumieri*, scorpionfish, cDNAs, lectin, lethal factor.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação esquemática dos principais peixes Scorpaeniformes	28
Figura 2: Mapa mostrando a distribuição geográfica de peixes-escorpião	29
Figura 3: Fotos do peixe-escorpião <i>S. plumieri</i>	30
Figura 4: Fotos dos espécimes dos gêneros <i>Pterois</i> e <i>Synanceia</i>	32
Figura 5: Comparação dos espinhos e glândulas de peçonha de Scorpaeniformes	33
Figura 6: Mapa circular do fagemídeo pBluescript SK (-)	66
Figura 7: Mapa circular do vetor pCR®8/GW/TOPO®	83
Figura 8: Gel agarose-formaldeído do perfil eletroforético do RNA total isolado do aparato peçonhento de <i>S. plumieri</i>	92
Figura 9: Cromatografia dos cDNAs de <i>S. plumieri</i> em Sepharose® CL-2B	93
Figura 10: Eletroforese em agarose 1% corado com brometo de etídio do DNA plasmidial obtidos de uma amostragem randômica da biblioteca	95
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de uma amostragem de clones da biblioteca após digestão com <i>EcoR</i> I	96
Figura 12: Distribuição do tamanho dos insertos sequenciados após screening randômico da biblioteca	97

Figura 13: Classificação de ESTs obtidas da biblioteca de <i>S. plumieri</i> baseado em suas semelhanças com funções descritas em BLASTn	98
Figura 14: Eletroforese SDS-PAGE e Western blot da peçonha total de <i>S. plumieri</i>	101
Figura 15: Identificação de clones positivos durante o screening com anticorpos	102
Figura 16: Distribuição do tamanho dos clones selecionados após screening com anticorpos anti-lectinas e anti-peçonha total	103
Figura 17: Classificação de ESTs após screening com anticorpos da biblioteca de <i>S. plumieri</i> baseado em suas semelhanças com funções descritas no BLASTn	104
Figura 18: Alinhamento de ESTs de <i>S. plumieri</i> com lectinas-like utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2	106
Figura 19: Alinhamento de SpLTL-1 com lily-lectinas utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2	107
Figura 20: Árvore filogenética da lily-lectina de <i>S. plumieri</i> (SpLTL-1)	109
Figura 21: Controle da qualidade da biblioteca de <i>S. plumieri</i>	110
Figura 22: Frequência das ESTs sequenciadas na biblioteca de <i>S. plumieri</i>	113
Figura 23: Classificação funcional dos clusters da biblioteca de <i>S. plumieri</i> com base nas similaridades funcionais descritas em banco de dados (BLAST2GO/NCBI)	115
Figura 24: Distribuição dos clusters aplicando os atributos da ferramenta GO utilizando as três hierarquias (BLAST2GO)	122
Figura 25: Representação gráfica das três hierarquias (BLAST2GO)	123

Figura 26: Localização dos primers em relação às subunidades α (A) e β (B) da toxina SNTX de *Synanceia horrida* 127

Figura 27: Géis de agarose 1% dos fragmentos obtidos por PCR com DNA fagemidial (biblioteca) e combinações de primers putativos para toxinas 128

Figura 28: Eletroforese SDS-PAGE 12% dos lisados bacterianos (porção solúvel) da expressão de um fragmento da subunidade β (SpTx- β) 131

Figura 29: Géis de agarose 1% dos produtos de amplificação utilizando cDNA de *S. plumieri* 132

Figura 30: Alinhamento do cDNA de *S. plumieri* com fosfoproteína-like PP28 utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2 133

Figura 31: Alinhamento do cDNA de *S. plumieri* com IRF-1 utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2 134

Figura 32: Alinhamento do cDNA de *S. plumieri* com domínio de titina imunoglobulina (Ig)-like utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2 136

Figura 33: Géis de agarose 1% dos fragmentos de DNA referentes às regiões da subunidade α identificados em *S. plumieri* utilizando diferentes combinações de primers 139

Figura 34: Esquema para a caracterização das subunidades α e β da toxina SpTx 142

Figura 35: Sequência nucleotídica e protéica da subunidade SpTx- α (A) de *S. plumieri* 143

Figura 36: Alinhamento da sequência de aminoácidos das subunidades α (A) de Scorpaeniformes 145

Figura 37: Géis de agarose 1% dos fragmentos de DNA referentes às regiões da subunidade β identificados em *S. plumieri* utilizando diferentes combinações de primers 150

Figura 38: Sequência nucleotídica e protéica da subunidade SpTx- β (B) de *S. plumieri* 152

Figura 39: Alinhamento da sequência de aminoácidos das subunidades β (B) de Scorpaeniformes 153

Figura 40: Alinhamento protéico entre as subunidades SpTx- α e SpTx- β de *S. plumieri* 156

Figura 41: Representação esquemática de α -hélices preditas nas subunidades α e β de SpTx de *S. plumieri* e Stonustoxina (SNTX) de *S. horrida* 159

Figura 42: Predição de α -hélices nas subunidades α e β de *S. plumieri* 161

Figura 43: Predição de APs (Antimicrobial Peptides) nas subunidades α e β de *S. plumieri* 162

Figura 44: Alinhamento de regiões identificadas nas subunidades α e β de SpTx de *S. plumieri* com peptídeos antimicrobianos 165

Figura 45: Árvore filogenética das toxinas de peixes Scorpaeniformes 167

Figura 46: Géis de agarose 1% e sondas radioativas marcadas com dCTP, [α - ^{32} P] de fragmentos putativos das subunidades α e β de *S. plumieri* 219

Figura 47: Distribuição do tamanho dos insertos sequenciados após screening com o uso de radioativo 221

Figura 48: Classificação de ESTs após screening com radioativo da biblioteca de *S. plumieri* baseado em suas semelhanças com funções descritas no BLASTn 222

Figura 49: Alinhamento da EST de *S. plumieri* com toxina hemolítica Avt-1-like utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2 224

Lista de Tabelas

Tabela 1: Toxicidade de peçonhas de alguns peixes Scorpaeniformes determinadas por diferentes vias de administração em camundongos	36
Tabela 2: Aspectos estruturais das toxinas isoladas das glândulas de peçonha de alguns Scorpaeniformes	41
Tabela 3: Meios de cultura recomendados e utilizados para a construção da biblioteca de bacteriófagos ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning	60
Tabela 4: Designação e sequência nucleotídica dos primers utilizados para reações de RT-PCR e clonagem	77
Tabela 5: Parâmetros de preparações de RNA total e mRNA obtidas por extração ácida com guanidina e por purificação em coluna de afinidade oligo(dT) celulose	91
Tabela 6: Títulos obtidos dos fagos e da biblioteca de cDNAs de <i>S. plumieri</i>	94
Tabela 7: Lista representativa de "hits" das ESTs em BLASTn dos clones sequenciados da biblioteca de <i>S. plumieri</i> ($\leq 10^{-10}$, score ≥ 80)	99
Tabela 8: Lista representativa de ESTs matches com BLASTn de clones obtidos após screening com anticorpos de <i>S. plumieri</i> ($\leq 10^{-10}$, score ≥ 80)	105
Tabela 9: Distribuição das ESTs da biblioteca de <i>S. plumieri</i>	112
Tabela 10: Relação dos clusters obtidos da biblioteca de <i>S. plumieri</i>	114
Tabela 11: A distribuição dos clusters identificados em <i>S. plumieri</i> e sua relação com as ESTs obtidas	116

Tabela 12: Classificação dos clusters e a relação ESTs/Clusters	117
Tabela 13: Relação das ESTs não-redundantes que pertencem a um único cluster	118
Tabela 14: Lista de ESTs excluídas das bases de dados funcionais Gene Ontology (GO) e Kegg Orthology (KO)	119
Tabela 15: Lista de clusters contemplados em bases de dados Gene Ontology (GO) e/ou Kegg Orthology (KO)	120
Tabela 16: Anotação funcional com a ferramenta GO dos transcritos classificados como “Processos biológicos” obtidos no BLAST2GO	123
Tabela 17: As vias metabólicas representadas na biblioteca de <i>S. plumieri</i> utilizando a ferramenta KEGG	126
Tabela 18: Alinhamentos significantes dos fragmentos obtidos por PCR com diferentes combinações de primers e DNA fagemidial, utilizando o banco de dados BLASTn e coleção de nucleotídeos não-reduntantes (nr/nt)	129
Tabela 19: Alinhamentos significantes dos fragmentos obtidos com diferentes combinações de primers e cDNA de <i>S. plumieri</i> , utilizando o banco de dados BLASTn e coleção de nucleotídeos não-reduntantes (nr/nt)	133
Tabela 20: Relação de primers identificados nas utilizadas sequências nucleotídicas de SpTx- α e SpTx- β	138
Tabela 21: Alinhamentos significantes dos fragmentos putativos para toxinas com cDNA de <i>S. plumieri</i> , utilizando o banco de dados BLASTn e coleção de nucleotídeos não-reduntantes (nr/nt)	140

Tabela 22: Identidade das sequências de aminoácidos das toxinas de Scorpaeniformes, correspondentes às subunidades α e β de *Scorpaena plumieri*, *Pterois lunulata*, *Pterois volitans*, *Pterois antennata*, *Hypodytes rubripinnis*, *Synanceia horrida*, *Synanceia verrucosa* e *Inimicus japonicus* 147

Tabela 23: Motivos LDP, WEVE e LDYE membros da família B30 obtidos no banco de dados com o algoritmo tBLASTn 149

Tabela 24: Comparação do tamanho das subunidades α e β das espécies: *Scorpaena plumieri*, *Pterois lunulata*, *Pterois volitans*, *Pterois antennata*, *Hypodytes rubripinnis*, *Synanceia horrida*, *Synanceia verrucosa* e *Inimicus japonicus* 158

Tabela 25: Alinhamentos e características estruturais de peptídeos antimicrobianos nas subunidades SpTx- α e SpTx- β de *S. plumieri* 164

Tabela 26: Lista representativa de ESTs matches com BLASTn de clones obtidos após screening com radioativo da biblioteca de *S. plumieri* ($\leq 10^{-10}$, score ≥ 80) 223

Lista de Abreviaturas e Símbolos

bp	pares de bases
°C	graus Célsius ou Centígrados
Cat α ou Cat β	primers com resíduos catiônicos α ou β
CD β	primer “Charles Darwin”
cDNA	ácido desóxi-ribonucléico complementar
cfu	unidade formadora de colônia
C-terminal	região carbóxi-terminal da proteína
Ci	Curie
μ Ci	microCurie (10^{-6} Ci)
Deg 1 ou Deg2	primer degenerado 1 ou 2
DL ₅₀	Dose Letal 50%
dNTP	desóxi-nucleotídeos
D.O.	densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	Expressed sequence tag
<i>et al.</i>	et all (e demais colaboradores)
μ g	micrograma (10^{-6} g)
H	na sequência de primers representa A, C ou T
h	hora
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
kb	kilobases
kDa	kiloDalton (10^3 Da)
L	litro
μ l	microlitro (10^{-6} L)
LB	Lúria-Bertani
Let α	primer fator letal α
M	na sequência de primers representa A ou C
M	concentração molar (moles/L)
mM	concentração milimolar (10^{-3} moles/L)
μ M	concentração micromolar (10^{-6} moles/L)
μ m	micrômetro (10^{-6} m)
mCi	miliCurie (10^{-3} Ci)
min	minuto
mg	miligrama (10^{-3} g)
ml	mililitro (10^{-3} L)
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA, Poli(A) ⁺ RNA	ácido ribonucléico mensageiro (poliadenilado)

MW	“molecular weight” (massa molecular)
N	na sequência de primers representa A, C, G ou T
ng	nanograma (10^{-9} g)
nM	concentração nanomolar (10^{-9} moles/L)
nm	nanômetro (10^{-9} m)
nr/nt	não-redundante/nucleotídeo
N-terminal	região amino-terminal da proteína
P.A.	“Pro Analysis” (padrão ACS- “American Chemical Society”)
pfu	unidade formadora de placas
pH	potencial hidrogeniônico
Pte α ou Pte β	primers <i>Pterois</i> α ou <i>Pterois</i> β
R	na sequência de primers representa A ou G
rpm	rotações por minuto
RT	“reverse transcriptase” (transcriptase reversa)
s	segundo
<i>S. plumieri</i>	<i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-Tx	<u><i>Scorpaena plumieri</i></u> <u>toxina</u>
Syn α ou Syn β	primers <i>Synanceia</i> α ou <i>Synanceia</i> β
U	unidade
V	Volts
W	Watts
W	na sequência de primers representa A ou T
Y	na sequência de primers representa C ou T
%	porcentagem

As demais abreviaturas serão explicadas quando forem citadas pela primeira vez no texto.

Lista de Siglas

BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool” (Banco de alinhamento básico local)
Expasy	“Expert Protein Analysis System” (Sistema especialista em análises de proteínas)
GO	“Gene Ontology” (Ontologia de genes)
KEGG	“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (Enciclopédia Kyoto de genes e genomas)
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)
ORF	“Open Reading Frame” (janela de leitura aberta)
PCR	“Polimerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)
RT-PCR	“reverse transcription-polymerase chain reaction” (transcrição reversa-reação em cadeia polimerase)

Siglas mencionadas somente uma vez serão explicadas no texto e não estão incluídas nessa lista.

Sumário

Parte I	23
Apresentação	24
1.0. Introdução geral	27
1.1. Biologia e distribuição dos peixes peçonhentos	27
1.2. Epidemiologia dos acidentes por peixes peçonhentos	31
1.3. Peçonhas de Scorpaeniformes: estrutura glandular, composição da peçonha e variabilidade	32
1.4. O envenenamento por peixes-escorpião	35
1.5. Ação citolítica de peçonhas de peixes	38
1.6. Fatores letais caracterizados em Scorpaeniformes	39
1.7. Aspectos estruturais de fatores letais	43
1.8. Lectinas contribuem com o envenenamento por peixes peçonhentos	46
1.9. Reatividade cruzada entre as toxinas de peixes peçonhentos	48
Objetivos	50
 Parte II	 51
Apresentação	52
2.0. Materiais	53
2.1. Métodos	54
2.2. Precauções tomadas para a realização dos experimentos	54
2.3. Extração do material biológico	56
2.3.1. Preparação de RNA total dos espinhos de <i>S. plumieri</i>	56
2.3.2. Isolamento de RNA mensageiro das preparações de RNA total de <i>S. plumieri</i>	57
2.3.3. Dosagem de ácidos nucléicos	58
2.3.4. Eletroforese em gel de agarose (MOPS: formaldeído)	58
2.4. Construção e caracterização da biblioteca de cDNAs de <i>S. plumieri</i>	60
2.4.1. Preparação do estoque de bactérias hospedeiras	60
2.4.2. Preparação de bactérias hospedeiras para a manipulação com fagos	61

2.4.3. Titulação e amplificação de fagos Helper ExAssist	61
2.4.4. Síntese ZAP-cDNA	62
2.4.5. Purificação dos cDNAs em resina Sepharose® CL-2B	64
2.4.6. Ligação dos insertos de cDNAs no vetor Uni-ZAP XR	65
2.4.7. Reação de empacotamento	66
2.4.8. Amplificação da biblioteca de cDNAs	67
2.4.9. Excisão "in vivo" do fagemídeo pBluescript® do vetor Uni-ZAP XR	68
2.4.10. Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes (Mini-preparações)	69
2.4.11. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição <i>EcoR</i> I	70
2.5. Screening da biblioteca de cDNAs de <i>S. plumieri</i>	71
2.6. Screening randômico da biblioteca de cDNAs	71
2.7. Transferência da biblioteca de cDNAs para filtros de membranas	72
2.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	73
2.7.2. Ensaio de Western blot	74
2.7.3. Screening da biblioteca com frações de anticorpos de <i>S. plumieri</i>	75
2.8. Screening das subunidades α e β de <i>S. plumieri</i> por RT-PCR	76
2.8.1. Desenho dos primers para as subunidades α e β de <i>S. plumieri</i>	76
2.8.2. Screening da biblioteca de cDNAs baseado no método de PCR	78
2.8.3. Expressão em sistema <i>E. coli</i> com tecnologia Gateway	79
2.9. Síntese da primeira fita de cDNA	80
2.9.1. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR convencional	80
2.9.2. Análise e quantificação dos produtos de PCR	81
2.9.3. Purificação dos produtos de PCR e isolamento de bandas em gel de agarose	82
2.9.4. Clonagem em pCR®8/GW/TOPO® TA	83
2.10. Preparações de sondas de DNA marcadas com dCTP [α - ³² P]	84
2.10.1. Preparações dos filtros de membrana para hibridização	85
2.10.2. Screening da biblioteca de cDNAs com sondas radioativas marcadas com dCTP [α - ³² P]	85
2.11. Sequenciamento do DNA	87
2.12. Análises bioinformáticas	88

	22
3.0. Resultados	91
3.1. Preparações de RNA de <i>S. plumieri</i>	91
3.2. Construção da biblioteca de cDNAs de <i>S. plumieri</i>	92
3.3. Screening randômico da biblioteca de cDNAs	95
3.4. Screening da biblioteca de cDNAs com anticorpos	100
3.5. Análise da qualidade e redundância da biblioteca de <i>S. plumieri</i>	109
3.6. Clusterização das ESTs encontradas na biblioteca de <i>S. plumieri</i>	113
3.6.1. Análise funcional dos clusters de <i>S. plumieri</i>	121
3.7. Screening da biblioteca de cDNAs pelo método de PCR	126
3.7.1. Expressão de um fragmento de SpTx- β como proteínas de fusão	130
3.8. Screening das toxinas de <i>S. plumieri</i> por RT-PCR	131
3.8.1. Identificação, construção quimérica e propriedades de SpTx- α de <i>S. plumieri</i>	137
3.8.2. Identificação, construção quimérica e propriedades de SpTx- β de <i>S. plumieri</i>	149
3.8.3. Comparação das estruturas primárias de SpTx- α e SpTx- β	156
3.8.4. Estrutura secundária em SpTx- α e SpTx- β e predição de sítios citolíticos	159
3.8.5. Árvore filogenética das toxinas de Scorpaeiformes	166
4.0. Discussão	168
 Parte III	 190
Considerações finais	191
5.0. Conclusão	192
6.0. Perspectivas	193
Referências bibliográficas	197
APÊNDICE I - Screening da biblioteca de cDNAs com sondas radioativas marcadas com dCTP [α - ^{32} P]	219
ANEXO I – Expressed sequence tags in venomous tissue of <i>Scorpaena plumieri</i> (Scorpaeniformes: Scorpaenidae)	225

Apresentação

Animais peçonhentos produzem toxinas com o auxílio de um aparato especializado. As peçonhas têm papel essencial nas possíveis interações com predadores, vítimas e competidores (HALSTEAD, 1988). O Reino Animal inclui mais de 100.000 mil espécies que possuem estruturas glandulares para a produção de peçonha (MEBS, 2002). Esta, por sua vez fornece uma variedade de vantagens para o animal, incluindo a habilidade para dominar e digerir eficientemente a vítima, além da defesa contra eventuais agressores.

Peçonhas são constituídas por misturas de vários peptídeos e proteínas, além de substâncias de composição química diversificada com variado espectro de ação farmacológica, que foram adaptadas pela seleção natural para agir em sistemas vitais das presas. Todos esses componentes podem atuar em uma miríade de alvos exógenos, tais como canais de íons, receptores químicos e sistemas enzimáticos (MÉNEZ et al., 2006), produzindo efeitos tóxicos que podem atuar de forma isolada ou sinérgica potencializando os danos teciduais locais ou sistêmicos.

Os envenenamentos animais, de uma forma geral, constituem um problema de saúde pública no Brasil devido à grande incidência e à gravidade dos efeitos. O quadro clínico desenvolvido por um acidentado pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha que foi inoculada, da localização da picada, da idade e espécie do animal e principalmente do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Há muitas pesquisas caracterizando química e farmacologicamente peçonhas de animais terrestres, como serpentes, escorpiões e aranhas. Propriedades biológicas de toxinas de animais terrestres têm sido largamente estudadas não somente devido à sua relevância no envenenamento, mas também pela possível utilização como moléculas modelos em testes fisiológicos e farmacológicos.

Em comparação com animais terrestres, peixes peçonhentos têm sido ignorados como uma fonte potencial de agentes farmacológicos. Esta deficiência se deve à ausência de uma estimativa confiável do número e diversidade de espécies de peixes peçonhentos, à falta de notificação dos acidentes, além das dificuldades nas

técnicas de obtenção e captura de espécimes marinhos, à extrema labilidade das peçonhas (HALSTEAD 1988; SMITH; WHEELER, 2006) e também pelas pesquisas se concentrarem em toxinas de espécies terrestres, que apresentam maior interesse epidemiológico (CHURCH; HODGSON, 2002b). Apesar disso, toxinas de efeitos diversos têm sido descritas (SCHAEFFER et al., 1971; KREGER, 1991; CHHATWAL; DREYER, 1992a; SHIOMI et al., 1993; GARNIER et al., 1995; SOSA-ROSALES et al., 2005; ANDRICH et al., 2010; RAMOS et al., 2012; GOMES et al., 2013; LOPES-FERREIRA et al., 2014a; LOPES-FERREIRA et al., 2014b).

Devido a diversidade de efeitos da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*, a potencial aplicação biotecnológica de suas toxinas e a falta de informações sobre peixes peçonhentos em geral, nesse trabalho decidimos catalogar as toxinas e outras moléculas biologicamente ativas produzidas pelas glândulas peçonhentas do peixe-escorpião e para isso, realizamos clonagem molecular em níveis de cDNA procurando detectar genes que codificam tais proteínas de interesse.

Paralelamente, para maior entendimento da diversidade molecular foi construída uma biblioteca de cDNAs. Usando essa biblioteca gênica objetivamos evidenciar novas toxinas, sequenciar parcial- ou totalmente genes de interesse, realizar estudos de alinhamento e de similaridade através de bancos de dados e relacioná-los com as atividades conhecidas da peçonha total. A geração de uma biblioteca do aparato peçonhento particularmente contribui para a expansão do limitado conhecimento no que concerne a estrutura de genes para toxinas e outras moléculas.

A clonagem de cDNAs é uma ferramenta poderosa para a elucidação da estrutura de proteínas, propiciando estudos da relação entre estrutura e função tornando um campo de pesquisa aberto e inesgotável nas investigações científicas.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós- Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais-MG e da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2007) sendo dividido em três partes. A **Parte I** - Introdução Geral ou revisão bibliográfica da literatura envolvendo aspectos gerais sobre o envenenamento por peixes-escorpião, composição, diversidade de toxinas e alterações locais e sistêmicas. A **Parte II** - apresenta a metodologia e resultados obtidos com a construção de uma

biblioteca de cDNAs e caracterização de ESTs do aparato peçonhento de *S. plumieri* em um artigo intitulado: Expressed sequence tags in venomous tissue of *Scorpaena plumieri* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) - artigo no prelo e, em seguida apresenta a clonagem e análise da estrutura primária de genes que codificam para toxinas encontradas na peçonha de *S. plumieri* em um artigo intitulado: Cloning of cDNAs and molecular analysis of the lethal factor from scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom (artigo em preparação). Por fim, a **Parte III** – Nesta parte serão reportadas as conclusões e perspectivas do nosso trabalho.

1.0. Introdução geral

1.1. Biologia e distribuição dos Peixes peçonhentos

Os peixes pertencem a um grupo extraordinário de Vertebrados aquáticos com brânquias, membros, se presentes, na forma de nadadeiras, e normalmente com escamas, eles representam quase a metade de todas as espécies de Vertebrados conhecidas. O maior grupo é a Subclasse Actinopterygii e representa a maior irradiação adaptativa conhecida dos Vertebrados, ocupando quase todos os nichos ecológicos imagináveis para Vertebrados aquáticos e compreende os peixes com nadadeiras suportadas por raios e esqueleto calcificados, tradicionalmente conhecidos como peixes ósseos e estão distribuídos em aproximadamente 27.000 espécies viventes (POUGH, 2008).

Em ambientes aquáticos, diversos seres vivos utilizam a estratégia de produção de peçonha para garantir a sobrevivência em ecossistemas altamente competitivos. O número de peixes peçonhentos era subestimado a somente 200 espécies (RUSSEL, 1965; CHURCH; HODGSON, 2002b), no entanto, Smith e Wheeler (2006) utilizando a capacidade preditiva de estudos filogenéticos, o conhecimento prévio da distribuição de peixes peçonhentos e uma extensiva inspeção na determinação da presença e ausência de glândulas de peçonha, estimaram o número e a identidade de peixes venenosos. Esses autores alinharam 1,1 milhões de pares de bases de tecidos de peixes e classificaram como peixes peçonhentos mais de 1.200 espécies distribuídas em 12 clados.

Estudos recentes mostram que os peixes peçonhentos são diversos e possuem representantes em quatro Ordens, como: Siluriformes, Batrachoidiformes, Scorpaeniformes e Perciformes. Em uma revisão de estudos filogenéticos realizada por Shinohara e Imamura, (2007) descreveram que somente na Ordem “Scorpaeniformes: Scorpaenoidei” (sensu NELSON, 1994) foi estimada a existência de 1.300 espécies.

A maioria dos peixes marinhos peçonhentos incluindo arraias, peixes-escorpião, certos tubarões e bagres sobrevivem em habitats tropicais de mares rasos e regiões de recifes de corais, embora algumas famílias, como a de arraias são principalmente bentônicos e também podem ser encontrados em águas muito profundas (RUSSELL, 1973).

Halstead (1959) dividiu os peixes Scorpaeniformes, família Scorpaenidae, em três tipos de gêneros com base na morfologia das glândulas de peçonha, nomeados: peixe-zebra ou peixe-leão (*Pterois*), peixe-escorpião propriamente dito (*Scorpaena*) e peixe-pedra (*Synanceia*). Com revisões na morfologia e aparato glandular, peixes-pedra foram retirados da família Scorpaenidae e foram classificados em uma nova família nomeada Synanceiidae (SMITH e WHEELER, 2006).

A Ordem Scorpaeniformes foi dividida em dois grupos: o grupo dos “sirobins” (inclui duas famílias, Triglidae e Peristediidae) e o grupo que inclui os peixes-escorpião (Scorpionfish), peixes-leão (Lionfish), peixes-pedra (Stonefish), dentre outros (HALSTEAD, 1966; NELSON, 1994). Este grupo é representado por doze famílias: Apstidae, Aploactinidae, Caracanthidae, Conggiopodidae, Gnathanacanthidae, Neosebastidae, Pataecidae, Scorpaenidae, Sebastidae, Setarchidade, Synanceiidae e Tetrarogidae.

A figura 1 mostra uma representação esquemática das três principais famílias de peixes peçonhentos pertencentes à Ordem Scorpaeniforme e que estão entre os mais estudados: *Scorpaena* e *Pterois* (Scorpaenidae), *Gymnapistes*, *Ablabys* e *Hypodytes* (Tetraogidae) e, *Inimicus* e *Synanceia* (Synanceiidae).

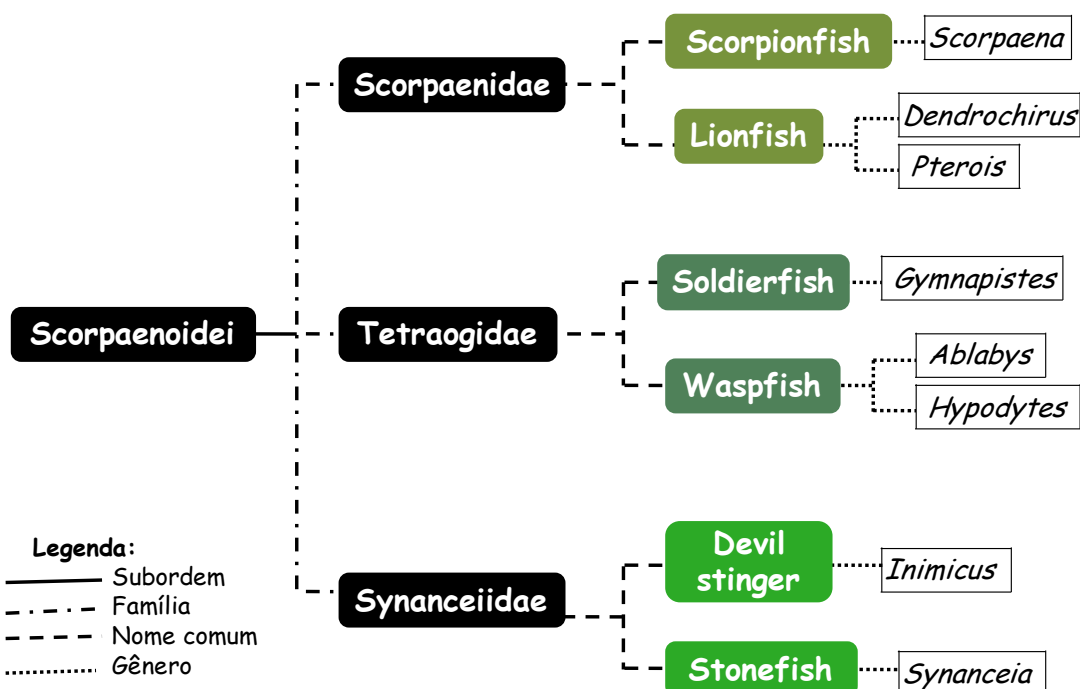


Figura 1: Representação esquemática dos principais peixes Scorpaeniformes. Scorpaenoidei (SMITH; WHEELER, 2006; SHINOHARA; IMAMURA, 2007).

As famílias Scorpaenidae e Synanceiidae são bem conhecidas por possuírem espécies que representam os peixes mais perigosos e peçonhentos do mundo (WILLIAMSON et al., 1996). Há relatos de aproximadamente 80 espécies dessas famílias implicadas na maioria dos envenenamentos severos em humanos ou que tenham sido estudadas por toxinologistas. Elas são largamente distribuídas por todos os mares tropicais, na maioria dos mares temperados e algumas espécies são encontradas em águas do Ártico (RUSSELL, 1973).

Os peixes-escorpião (*Scorpaena* sp) são exclusivos da Costa do Oceano Atlântico, os peixes-pedra (*Synanceia* sp) e os peixes-leão (*Pterois* sp) são nativos de regiões Indo-pacíficas (GWEE et al., 1994; HADDAD, 2000). Espécies dos gêneros *Pterois*, *Ablabys*, *Inimicus* e *Hypodytes* são comuns ao longo da Costa do Japão (KIRIAKE et al., 2013), enquanto que espécies de *Gymnapistes* habitam mares da Costa Oeste e Sul da Austrália (CHURCH; HODGSON, 2001) (Figura 2). Atraídos pela aparência elegante de espécimes de *Pterois*, indivíduos são largamente coletados de seus habitats naturais para serem utilizados em aquários ou introduzidos em mares quentes da Costa do Atlântico, constituindo atualmente espécies invasoras nesses ambientes (ALBINS; HIXON, 2008).

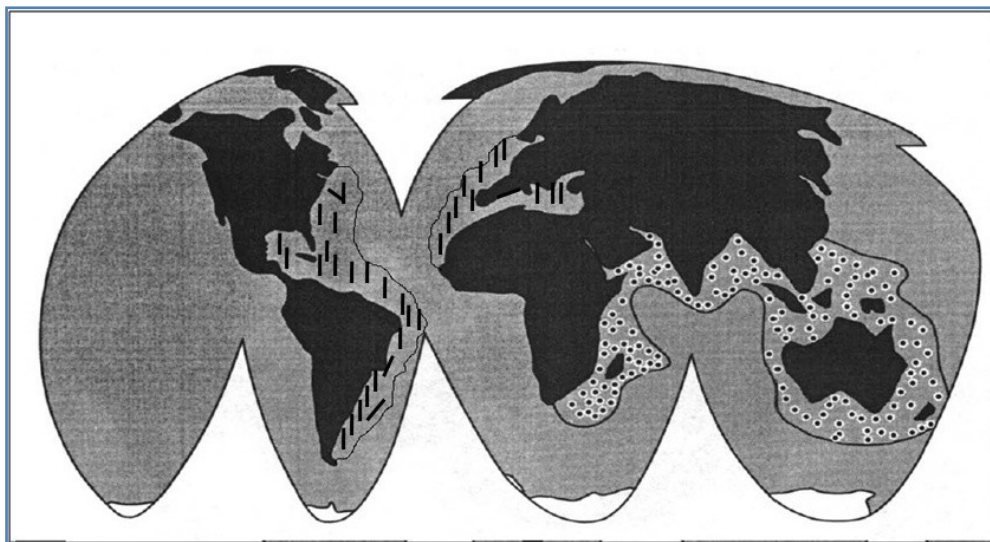


Figura 2: Mapa mostrando a distribuição geográfica de peixes-escorpião. (/) *Scorpaena* e (●) *Gymnapistes*, *Ablabys*, *Hypodytes*, *Pterois*, *Inimicus* e *Synanceia* (GWEE et al., 1994, com modificações).

Na Costa brasileira são encontrados espécies de oito gêneros da família Scorpaenidae (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980; CARVALHO-FILHO, 1999), sendo que somente peixes do gênero *Scorpaena*, espécies: *S. plumieri* Bloch, 1789; *S. brasiliensis* Cuvier, 1829; *S. grandicornis* Cuvier e Valenciennes, 1829; *S. isthmensis* Meek e Hildebrand, 1928 e *S. dispar* Longley e Hildebrand, 1940; estão associados com envenenamentos em seres humanos (HADDAD, 2000). Algumas dessas espécies também são encontradas na Flórida, Golfo do México, Bahamas, Caribe e Bermudas (HUMANN, 1994).

Membros do gênero *Scorpaena* são comumente encontrados em mares rasos, em baías, ao longo de praias arenosas, costas rochosas ou em recifes de corais. Espécimes apresentam uma aparência bizarra, possuem hábitos dissimulados, se escondem facilmente, além de possuírem coloração protetiva, o que os tornam mestres na camuflagem, predispondo a ocorrência de acidentes (RUSSELL, 1965; SCHAEFFER et al., 1971). Quando são removidos da água se sentem ameaçados apresentando hábito defensivo de tornar os espinhos dorsais eretos e sinalizar perigo através das brânquias (BUCHERL; BUCKLEY, 1971; HALSTEAD, 1980).

Espécimes de *S. plumieri* (Figura 3) são conhecidos popularmente como aniquim, aniquim-de-pedra, mamangá, moréia-atí ou simplesmente peixe-escorpião preto e são facilmente identificados pela presença de manchas brancas na região axilar das nadadeiras peitorais.

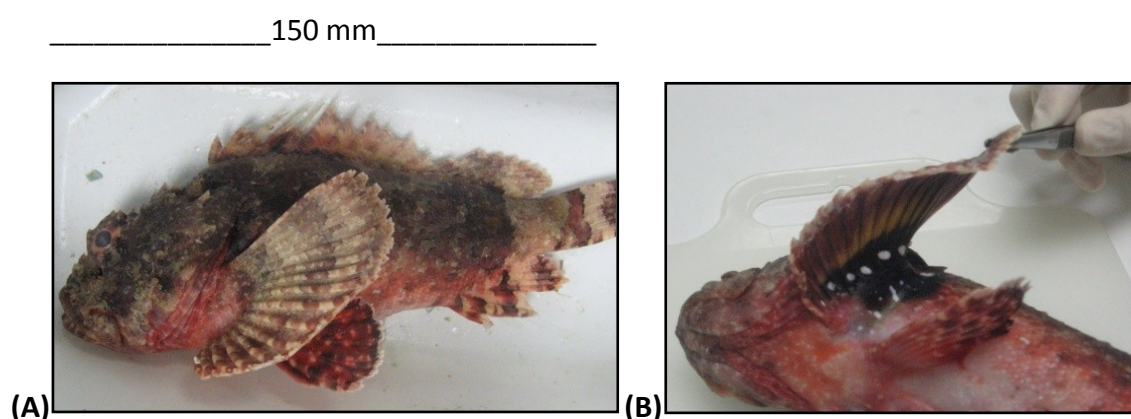


Figura 3: Fotos do peixe-escorpião *S. plumieri*. (A) Foto de um espécime de peixe-escorpião jovem utilizado nesse trabalho e **(B)** nadadeiras dorsais mostrando manchas brancas na região axilar (Arquivo pessoal).

1.2. Epidemiologia dos acidentes por peixes peçonhentos

Acidentes por animais peçonhentos acarretam sérios problemas à saúde humana e por isso, deveriam ser obrigatoriamente notificados ao Ministério e às Secretarias Estaduais de Saúde (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Peixes peçonhentos são formados por um grupo diverso que habitam desde regiões costeiras a recifes de corais até oceanos. O envenenamento causa no mínimo 50.000 injúrias por ano com sintomas que variam de edema, eritema, intensa dor, febre e eventualmente morte (HADDAD, 2003).

Acidentes por peixes relatados com injúrias em humanos são descritos principalmente nas seguintes famílias: Dasyatidae, Gymnuridae, Myliobatidae e Rhinopteridae (arraias marinhas), Ariidae (bagres-marinho), Scorpaenidae (peixes-escorpião propriamente dito e peixes-leão), Synanceiidae (peixes-pedra) e Batrachoididae (peixes-sapo). Em ambientes de água doce os peixes das famílias Pimelodidae (bagres) e Potamotrygonidae (arraias) são as mais importantes (HADDAD, 2000).

Um estudo epidemiológico da fauna marinha brasileira revelou que em 236 ocorrências de acidentes com animais peçonhentos, 50% foram provocados por ouriços-do-mar, 25% por cnidários (cubomedusas e caravelas) e 25% por peixes (bagres, arraias e peixes-escorpião). Existe uma relação inversa entre a frequência e a gravidade dos acidentes causados por bagres, arraias e peixes-escorpião, sendo os primeiros mais comuns e de menor gravidade e os últimos mais raros e muito graves, com intensa sintomatologia sistêmica (HADDAD et al., 2003).

Acidentes por peixes-escorpião, há tempos, são largamente conhecidos por toxinologistas. Russell (1965) estimou que nos Estados Unidos ocorriam aproximadamente 300 envenenamentos por ano.

A epidemiologia dos envenenamentos por peixes-escorpião aponta para um perfil comum, os acidentes não são notificados, há um baixo risco de morte e os indivíduos acometidos são principalmente do sexo masculino, pescadores e nadadores profissionais (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980; CARVALHO-FILHO, 1999; HADDAD et al., 2003). Os acidentes são frequentemente produzidos por espinhos dorsais e menos

comum pelos espinhos pélvicos ou anais e, na maioria dos casos são devido ao manuseio descuidado com as mãos ao remover o peixe da rede ou do anzol.

Contatos com espécimes do gênero *Pterois* são comuns pelas pessoas que são atraídas enganosamente pela aparência bonita e colorida do animal (Figura 4A), enquanto que, peixes-pedra (*Synanceia* sp) (Figura 4B) por camuflarem muito bem em regiões de mares rasos e arenosos provocam acidentes quando as pessoas caminham por essas praias (HALSTEAD, 1988).

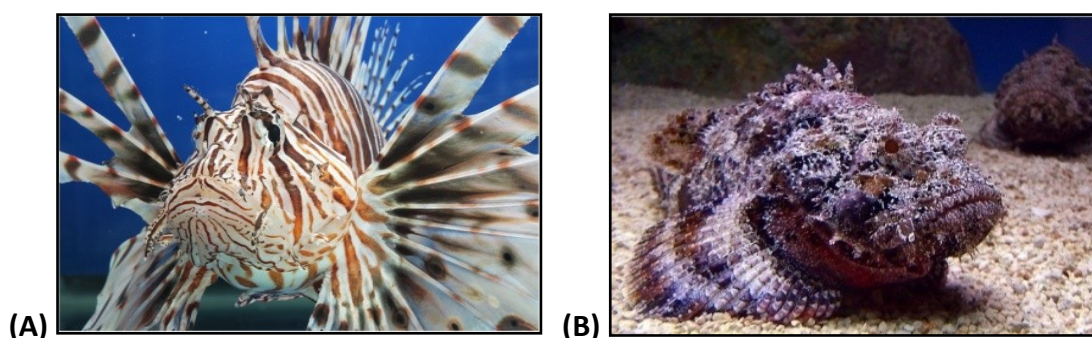


Figura 4: Fotos dos espécimes dos gêneros *Pterois* e *Synanceia*. (A) Foto de um espécime de lionfish (*Pterois volitans*) e (B) Foto de um espécime de stonefish (*Synanceia verrucosa*). Fotos obtidas do Aquário Nacional Baltimore, MD (www.aqua.org).

1.3. Peçonhas de Scorpaeniformes: estrutura glandular, composição da peçonha e variabilidade

A síntese de toxinas de peixes peçonhentos ocorre em tecidos glandulares especializados associados a aparatos de distribuição formados por espinhos localizados no dorso (o mais comum), peito, opérculo, pelve, ânus e áreas caudais, que variam consideravelmente em tamanho, estrutura, e presença ou ausência, dependendo da espécie (RUSSEL, 1965).

O aparato peçonhento de peixes-escorpião tem sido descrito em considerável detalhe. Na maioria das espécies, consistem de uma série de espinhos dorsais (13) em *Synanceia* e *Pterois*, e (12) em *Scorpaena*, e por fim, anais (3) e pélvicos (2) em praticamente todos os membros de Scorpaeniformes (RUSSEL, 1965; HALSTEAD, 1988). Os espinhos são envolvidos por uma bainha tegumentária, o complexo

glandular de produção da peçonha encontra-se dentro dos sulcos ântero-lateral (RUSSELL, 1973) e a liberação da peçonha ocorre por pressão mecânica do espinho, em que o tegumento é rompido permitindo que a peçonha escape e atinja a vítima (SCHAEFFER et al., 1971; HALSTEAD, 1980).

As glândulas de peçonha variam marcadamente de um gênero para outro, as de *Pterois* são pequenas no tamanho e bem desenvolvidas, com ductos não evidentes, as de *Scorpaena* possuem tamanho moderadas, bem desenvolvidas e com ductos não evidentes, enquanto que glândulas de *Synanceia* são muito largas em tamanho e são altamente desenvolvidas com presença de ductos evidentes (Figura 5) (HALSTEAD, 1980; GOPALAKRISHNAKONE; GWEE, 1993; SMITH; WHEELER, 2006).

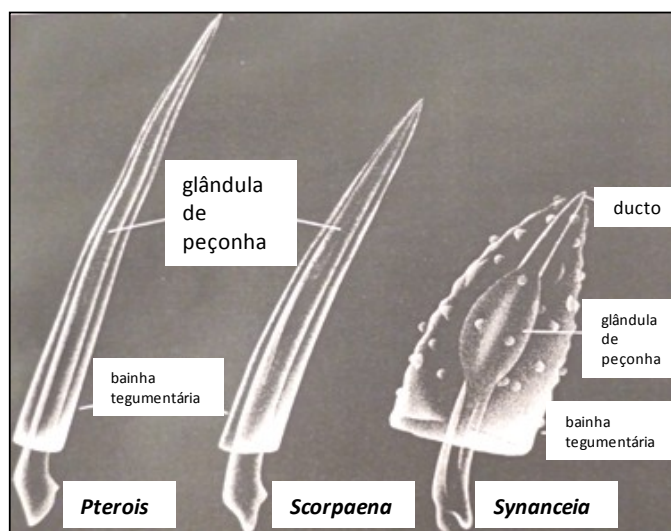


Figura 5: Comparação dos espinhos e glândulas de peçonha de Scorpaeniformes.
Gêneros: *Pterois*, *Scorpaena* e *Synanceia*, respectivamente (RUSSELL, 1965).

O modo como o animal secreta as toxinas depende, em parte da finalidade do seu uso. Em geral, os componentes tóxicos secretados por animais peçonhentos a partir da região oral, como ocorre em glândulas salivares modificadas, são usados pelo animal durante um ato ofensivo tal como a obtenção de alimentos. Isso é particularmente evidente em serpentes e em menor grau, em algumas espécies de aranhas.

No caso das toxinas liberadas a partir de outras regiões aborais, como em agulhões de escorpiões e arraias, e espinhos de peixes, as células produtoras de

peçonha são simplesmente coleções de células secretórias especializadas encontradas no tecido dérmico e confinadas que foram adaptadas para o armamento defensivo do animal contra possíveis predadores (RUSSELL, 1973; GOPALAKRISHNAKONE; GWEE, 1993).

Como é de antecipar, peçonhas animais derivadas de regiões orais tendem a possuir um teor enzimático superior provocando uma maior destruição de tecidos, enquanto que aquelas derivadas de regiões aborais mostram ausência ou somente algumas enzimas proteolíticas, embora como um todo seja mais letal podendo provocar muita dor nas vítimas, justificando os mecanismos defensivos (RUSSELL, 1973).

Análises das glândulas de peçonha de peixes-escorpião em microscopia eletrônica demonstram que o modo de secreção de toxinas é único e completamente diferente daqueles modos encontrados em serpentes, escorpiões ou aranhas. As proteínas secretadas não apresentam sequência N-terminal sinalizadora e modificações pós-traducionais comuns em células eucarióticas, como presença de cisteínas livres e sítios potenciais de glicosilação (GHADESSY et al., 1996). Um estudo detalhado da glândula de peçonha de *Synanceia horrida* revela que as células secretórias não possuem organelas como aparato de Golgi e retículo endoplasmático, as células inteiras se transformam em grânulos, sugerindo um tipo de secreção holócrina, apesar de que adicionais estudos devem progredir para elucidar as exatas organelas secretórias envolvidas na produção da peçonha (CAMERON; ENDEAN, 1972; GOPALAKRISHNAKONE; GWEE, 1993).

As peçonhas de peixes podem ser letais para Vertebrados, dependendo da dose e da vítima. Os envenenamentos mostram ação fisiofarmacológica e certas propriedades químicas comuns (BUCHERL; BUCKLEY, 1971; CHURCH; HODGSON, 2002b), produzindo sintomas similares em envenenamentos humanos e em experimentos animais, diferindo principalmente com relação à potência da peçonha e na intensidade dos efeitos (HALSTEAD, 1980).

Os principais componentes tóxicos são as proteínas, embora outras substâncias ativas possam ser encontradas, tais como: acetilcolina ou colinomiméticos, catecolamina, histamina, outras aminas biogênicas, prostaglandinas e tromboxanos (AUERBACH et al., 1987; GARNIER et al., 1996; CHURCH; HODGSON, 2002a; CHURCH;

HODGSON, 2002b; FIGUEIREDO et al., 2009). Dentre as atividades enzimáticas encontradas nessas peçonhas já foram detectadas, citolisinas, proteinases, fosfatases, aminopeptidases (KHOO et al., 1992; GWEE et al., 1994; KHOO, 2002; CARRIJO et al., 2005), além disso, já foram identificadas altos níveis de atividades hialuronidásica em membros de *Synanceia* (NG et al., 2005; MADOKORO et al., 2011) e *Scorpaena* (CASSOLI, 2008). Entretanto, atividades enzimáticas como aquelas encontradas em peçonhas de serpentes, como L-amino oxidases e fosfolipases A₂ não são observadas em peixes peçonhentos (GWEE et al., 1994), com exceção por exemplo, da peçonha da arraia dulcícola *Potamotrygon falkneri* que apresenta atividade fosfolipásica (HADDAD et al., 2004). Toxinas citolíticas que atuam por mecanismos não-enzimáticos também são descritas em vários outros grupos como: bactérias, insetos, cnidários, anfíbios e répteis (KINI; EVANS, 1989; SINGLETARY et al., 2005).

Toxinas estudadas em peixes Scorpaeniformes assim como de outros peixes peçonhentos, tais como arraias, peixes-sapo e peixes-escorpião são proteínas extremamente lábeis de alta massa molecular, o que dificulta sua purificação e estudo (SHIOMI et al., 1989; GARNIER et al., 1995). De fato, a literatura indica que poucas proteínas de peixes peçonhentos foram purificadas e caracterizadas em nível molecular. Uma pesquisa no banco de dados (UniProtKB/Swiss-Prot) para estruturas primárias revelam somente algumas entradas para componentes tóxicos protéicos de peixes peçonhentos, em contraste centenas de entradas são observadas para toxinas de serpentes, aranhas e escorpiões. Esses dados confirmam o quanto peçonhas de animais terrestres são mais estudadas do que de animais aquáticos e também que estes últimos possuem menor quantidade de proteínas com propriedades tóxicas.

1.4. O envenenamento por peixes-escorpião

O envenenamento por Scorpaeniformes geralmente provoca sintomas locais, como: dor, rubor e inchaço, podendo levar ao óbito nos casos mais severos (RUSSELL, 1973; HALSTEAD, 1988; CHURCH; HODGSON, 2002b). Efeitos fisiológicos das peçonhas são conhecidos, mostrando ser na maioria menos potentes, embora mais variável em efeitos (HALSTEAD, 1980), quando comparadas com outras peçonhas de animais

marinhos. Estudos clínicos e farmacológicos indicam que os componentes ativos de peixes peçonhentos apresentam atividades citolítica, hemolítica, inflamatória, neurotóxica, neuromuscular e letal, além de pronunciados efeitos cardiovasculares (SCHAEFFER et al., 1971; GWEE et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 2009).

A toxicidade das peçonhas de vários peixes-escorpião utilizando diferentes vias de administração em camundongos demonstra uma variação da intensidade do envenenamento entre as espécies, sendo as peçonhas de *Pterois* e *Scorpaena* menos tóxicas que as de *Synanceia*, as quais são altamente tóxicas, ou até mesmo letais, com DL_{50} comparável ao de peçonhas de serpentes (FIGUEIREDO et al., 2009).

A tabela 1 mostra a DL_{50} de alguns peixes Scorpaeniformes. No entanto, alguns fatores impedem comparações acuradas de toxicidade/letalidade como o uso de diferentes métodos experimentais de extração e armazenamento, assim a atividade biológica é abolida pela água destilada, liofilização em tampões, além de sucessivos congelamentos e descongelamentos das amostras. Contudo, se torna difícil distinguir o efeito da toxina, pois se ela foi degradada ou desnaturada, um componente hemolítico pode ser destruído e outros efeitos farmacológicos podem ser observados, como a presença sintomática de uma fase hipertensiva seguida de hipotensão. Tais efeitos bifásicos já foram observados na peçonha total de *S. plumieri* (GOMES et al., 2010).

Tabela 1: Toxicidade de peçonhas de alguns peixes Scorpaeniformes determinadas por diferentes vias de administração em camundongos (FIGUEIREDO et al., 2009).

Espécie	DL_{50} da peçonha
<i>Synanceia verrucosa</i>	2,5 µg/g (i.v.)
<i>Synanceia horrida</i>	0,36 µg/kg (i.v.)
<i>Synanceia trachynis</i>	1,6 mg/kg (i.p.)
<i>Pterois volitans</i>	42,5 µg/kg (i.p.)
<i>Scorpaena plumieri</i>	0,28 mg/kg (i.v.)

Em estudos prévios, foi demonstrado que a peçonha de *S. plumieri* é letal (DL_{50} de 0,28 mg/kg, i.v. em ratos), induzindo a princípio uma abrupta queda na pressão

arterial e diminuição da frequência respiratória, podendo conduzir a vítima ao óbito por parada cardíaca e respiratória (CARRIJO et al., 2005). Desordens no sistema cardiovascular foram avaliadas em corações de ratos com preparações experimentais “*in vitro*” e “*in vivo*” (GOMES et al., 2010).

Além disso, a peçonha induziu a liberação de mediadores pró-inflamatórios, efeitos que podem estar associados com as mudanças histopatológicas observadas nos tecidos após o envenenamento (MENEZES et al., 2012). Mediadores inflamatórios foram caracterizados em preparações de pulmões injuriados de ratos (SANTOS et al., 2008) e parecem contribuir com o envenenamento, aumentando a permeabilidade dos brônquios semelhante ao observado durante o eritema ou hemorragia, sugerindo uma mudança de interações da matriz celular (THEAKSTON; KAMIGUTI, 2002).

Contudo, em *S. plumieri* foi demonstrado presença de atividades hemorrágica, hemolítica em eritrócitos de coelhos, proteolíticas, efeitos hipotensivos dose-dependente, danos pulmonares e inflamação (ANDRICH et al., 2010; GOMES et al., 2010; MENEZES et al., 2012). Além disso, quando a peçonha foi injetada intravenosamente em camundongos, foi capaz de induzir perda da coordenação muscular e paralisia, micção, hipersalivação, convulsão e insuficiência respiratória, seguida de morte, sintomas que sugerem efeitos neurotóxicos da peçonha (CARRIJO et al., 2005; SANTOS et al., 2008). Apesar do baixo risco de morte, o envenenamento provocado por esses espécimes são graves.

Em 2003, Haddad Jr. e seus colaboradores mostraram que injúrias causadas por peixe-escorpião (*S. plumieri* e *S. brasiliensis*) em pescadores no sudoeste do Oceano Atlântico (costa brasileira) provocam intensa dor, edema, eritema, necrose na pele, adenopatia, náusea, vômito, agitação, mal-estar, sudorese, diarreia, taquicardia e arritmias.

As respostas cardiovasculares induzidas por peçonhas de peixes podem ser resultado da atividade citolítica de toxinas hemolíticas, alguns autores sugerem que toxinas perturbadoras de membranas poderiam afetar o comportamento normal das células endoteliais e a função cardíaca, desencadeando influxo de íons Ca^{2+} e uma consequente ativação da cascata de síntese de óxido nítrico, levando ao vasorelaxamento e a hipotensão (LOW et al., 1993; CHURCH; HODGSON, 2002b; OUANOUNOU et al., 2002).

Uma parte dos sintomas e efeitos clínicos associados com envenenamento por peixes-escorpião resulta da ação de uma proteína dimérica com propriedades hemolíticas e citolíticas, conhecida como fator letal (KREGER, 1991). Revisões recentes (CHURCH; HODGSON, 2002b; KHOO, 2002; FIGUEIREDO et al., 2009) indicam que já foram encontradas poucas toxinas de peixes peçonhentos por espécie e cada uma delas apresenta propriedades citolíticas. Apesar da limitada diversidade molecular em toxinas, peçonhas de peixes exibem atividades biológicas diferenciadas, como já foi relatado anteriormente.

1.5. Ação citolítica de peçonhas de peixes

Toxinas de peçonhas animais com atividade hemolítica ou citolítica fazem parte de um repertório importante no desempenho de ações ofensivas e defensivas, elas auxiliam no ataque e digestão de hospedeiros (no caso de toxinas) e fornecem proteção por matar algum invasor ou prevenir a invasão (no caso de proteínas antibacterianas e peptídeos), em ambos os casos ocorre lise celular por uma variedade de mecanismos enzimáticos ou não-enzimáticos (KINI; EVANS, 1989).

A propriedade mais marcante compartilhada pelas peçonhas de peixes é a de provocarem hemólise “*in vitro*”. A atividade hemolítica é seletiva para eritrócitos de algumas espécies (espécie-específica), sendo muito potente em coelhos (KREGER, 1991). Os eritrócitos de humanos, porcos e galinhas são totalmente resistentes e uma fraca atividade hemolítica é observada em eritrócitos de ratos e bovinos (FIGUEIREDO et al., 2009).

O efeito sobre eritrócitos de coelhos foi demonstrado para várias peçonhas, como por exemplo: *Plotosus lineatus* (SHIOMI et al., 1986), *Trachinus draco* (CHHATWAL; DREYER, 1992b), *Pterois* sp (KIRIAKE; SHIOMI, 2011), *S. plumieri* (ANDRICH et al., 2010) e em espécies *Synanceia* sp (KREGER, 1991; GWEE et al., 1994; GARNIER et al., 1995).

A ação hemolítica dessas peçonhas sobre os eritrócitos é interpretada como uma hemólise direta, uma vez que, peçonhas de peixes são quase sempre desprovidas de atividade fosfolipásica A₂ (SHIOMI et al., 1989; KHOO et al., 1992; HOPKINS et al.,

1994; LOPES-FERREIRA et al., 1998; HOPKINS; HODGSON, 1998; HAHN e O'CONNOR, 2000). Chhatwal e Dreyer, 1992b, sugeriram que a atividade hemolítica da peçonha de *Trachinus draco* é precedida pela ligação do componente hemolítico para um receptor de proteína localizado na superfície dos eritrócitos. Quando toxinas formadoras de poros interagem com lipídios ou proteínas da membrana externa, pequenos osmólitos podem se mover livremente pelas membranas, tornando o interior da célula hiperosmótico, o que induz influxo de água, produzindo como resultado inchaço e subsequente lise celular (MENESTRINA et al., 1994).

Alguns trabalhos também demonstram que peçonhas de peixes provocam efeitos citotóxicos para vários tipos celulares, incluindo células tumorais (FAHIM et al., 2002; SATOH et al., 2002; SRI BALASUBASHINI, 2006; SOPRANI, 2008).

1.6. Fatores letais caracterizados em Scorpaeniformes

Proteínas com propriedades hemolíticas e citolíticas, conhecidas como fatores letais já foram isoladas de peixes-escorpião e elas são constituídas por duas subunidades parcialmente diferentes (designadas subunidade α para o fragmento menor e subunidade β para o fragmento maior) unidas por interações não-covalentes (UEDA et al., 2006). Em membros de Scorpaeniformes, uma proteína com propriedades letais de massa molecular em torno de 150 kDa, foi inicialmente parcialmente purificada da peçonha de *Synanceia horrida* por Austin et al., 1965. Subsequente a esse trabalho, Deakins e Saunders, 1967, conseguiram isolar parcialmente a mesma proteína, cuja atividade foi de dez vezes mais tóxica. Em seguida, Poh e colaboradores em 1991, purificaram uma toxina letal, nomeada de stonustoxina (SNTX) de 148 kDa constituída por duas subunidades nomeadas α (71 kDa) e β (79 kDa), também isolada de *Synanceia horrida*. A estrutura primária dos genes que codificam essa proteína foram caracterizados por clonagem do cDNA em 1994 e 1996 por Ghadessy e seus colaboradores. Na tentativa de elucidar relações de estrutura-função da Stonustoxina, estudos cristalográficos foram realizados e revelaram que, pelo tamanho da unidade assimétrica requer que a proteína seja um dímero, com uma molécula de stonustoxina por unidade assimétrica. A estabilidade

relativa sugere a formação de complexos heterodiméricos entre as subunidades (YEW et al., 1999).

Fatores letais também foram isolados de peçonhas em outras espécies de peixes-pedra, a saber: uma citolisina monomérica de 90 kDa (SHIOMI et al., 1993) e uma proteína tetramérica de 322 kDa nomeada de verrucotoxina (VTX) (GARNIER et al., 1995) foram isoladas de *Synanceia verrucosa* e, através de experimentos de clonagem do cDNA foi possível caracterizar a estrutura primária completa da subunidade β putativa (GARNIER et al., 1997a). Recentemente, nessa espécie foi identificada uma proteína dimérica, a neoverrucotoxina (NeoVTX, 166 kDa) foi purificada e os mRNAs foram elucidados por métodos de clonagem do cDNA (UEDA et al., 2006).

Por fim, trachynilysina (TLY), uma proteína que atua em junções neuromusculares de 158 kDa, foi isolada de *Synanceia trachynis* (COLASANTE et al., 1996), ela causa massiva liberação e depleção de acetilcolina de nervos terminais. Em altas concentrações, as toxinas provocam despolarização irreversível de células musculares, danificando fibras musculares e nervosas, conduzindo à inibição da função neuromuscular e paralisia esquelética (COLASANTE et al., 1996; OUANOOUNOU et al., 2002). A estrutura primária do mRNA da trachynilysina ainda não foi elucidada. O efeito hemolítico exercido por essa toxina é similar ao descrito para outras proteínas letais de Scorpaeniformes, em que a atividade ocorre através da formação de poros nas membranas celulares, processo que será descrito mais adiante. A tabela 2 mostra as principais proteínas descritas até hoje em Scorpaeniformes.

Tabela 2: Aspectos estruturais das toxinas isoladas das glândulas de peçonha de alguns Scorpaeniformes.

Espécie	Toxina	Aspectos estruturais	Atividade descrita	Referência
<i>Synanceia verrucosa</i>	Verrucotoxina (VTX)	322 kDa (4 subunidades) 2 α (83 kDa) e 2 β (78 kDa)	Cardiovascular, hemolítica	Garnier et al., 1995
	Proteína monomérica	90 kDa	Letal, hemolítica	Shiomi et al., 1993
	Neoverrucotoxina (NeoVTX)	166 kDa (2 subunidades) α (75 kDa) e β (80 kDa)	Letal, hemolítica	Ueda et al., 2006
<i>Synanceia horrida</i>	Stonustoxina (SNTX)	148 kDa (2 subunidades) α (71 kDa) e β (79 kDa)	Cardiovascular, hemolítica, nociceptiva, edematogênica, neuromuscular	Ghadessy et al., 1996
<i>Synanceia trachynis</i>	Trachynilisina (TLY)	159 kDa (2 subunidades) α (76 kDa) e β (83 kDa)	Cardiovascular, hemolítica, edematogênica, neuromuscular	Colasante et al., 1996
<i>Pterois volitans</i>	PvTx	150 kDa (2 subunidades) α (75 kDa) e β (75 kDa)	Hemolítica, cardiovascular, neuromuscular	Kiriake; Shiomi, 2011
<i>Pterois antennata</i>	PaTx	150 kDa (2 subunidades) α (75 kDa) e β (75 kDa)	Hemolítica, cardiovascular	Kiriake; Shiomi, 2011
<i>Pterois lunulata</i>	PITx	160 kDa (2 subunidades) α (80 kDa) e β (80 kDa)	Hemolítica, nociceptiva, edematogênica	Kiriake et al., 2013
<i>Inimicus japonicus</i>	IjTx	160 kDa (2 subunidades) α (80 kDa) e β (80 kDa)	Hemolítica nociceptiva, edematogênica	Kiriake et al., 2013
<i>Hypodytes rubripinnis</i>	HrTx	160 kDa (2 subunidades) α (80 kDa) e β (80 kDa)	Hemolítica nociceptiva, edematogênica	Kiriake et al., 2013
<i>Scorpaena plumieri</i>	Sp-CTx	150 kDa (2 subunidades) α e β	Cardiovascular, hemolítica	Gomes et al., 2013

SNTX, VTX e TLY estão entre as toxinas mais estudadas de peixes peçonhentos e algumas características estruturais e propriedades farmacológicas já foram descritas (GWEE et al., 1994; GHADESSY et al., 1996; KHOO, 2002; UEDA et al, 2006). SNTX compartilha efeitos e sintomas de envenenamento similar as de outros peixes Scorpaeniformes, essa proteína exibe atividades biológicas multifuncionais (hemólise, alterações na permeabilidade vascular, agregação plaquetária, indução de edema e vasorelaxamento endotelial), (POH et al., 1991; KHOO et al., 1992; LOW et al., 1993; LOW et al., 1994; KHOO et al., 1995; GARNIER et al., 1997b). Entretanto a causa primária de morte dessa toxina é atribuída ao potente efeito hipotensivo, em que a proteína causa um influxo de Ca^{2+} , subsequente produção de óxido nítrico (NO) e ativação de canais de K^{+} , provocando progressivamente um potente vasorelaxamento endotelial de vasos intactos, culminando em hipotensão irreversível (SUNG et al., 2002). Interessantemente, Liew e seus colaboradores (2007), demonstraram que ácido

sulfídrico (H_2S) atua sinergicamente com NO potencializando o relaxamento provocado pela toxina. Apesar da abundância nas informações de dados farmacológicos, mecanismos detalhados de ação a nível molecular foram pouco elucidados.

Baseando nas características químicas e biológicas em comum observadas entre as toxinas de Scorpaeniformes, foi assumido que a estratégia de clonagem do cDNA usando primers desenhados a partir da estrutura primária das toxinas caracterizadas em *Synanceia* são úteis para elucidar as estruturas primárias do RNA mensageiro. De fato, recentemente essa estratégia foi empregada com sucesso e possibilitou a caracterização de toxinas de duas espécies de *Pterois* (*Pterois antennata* e *Pterois volitans*) (KIRIAKE; SHIOMI, 2011). Em estudos mais recentes, esses autores utilizaram a mesma estratégia para elucidar as estruturas primárias de três espécies de Scorpaeniformes: *Pterois lunulata*, *Inimicus japonicus* e *Hypodytes rubripinnis*, espécies pertencentes a diferentes famílias (KIRIAKE et al., 2013).

No gênero *Scorpaena*, poucos estudos têm sido dedicados aos espécimes, algumas propriedades químicas foram estudadas utilizando a peçonha do peixe-escorpião da Califórnia, *Scorpaena guttata*, do qual foram identificadas frações semi-purificadas com propriedades letais (SCHAEFFER et al., 1971). Em *S. plumieri*, nosso grupo de pesquisa purificou e caracterizou parcialmente uma proteína citolítica vasoativa designada Sp-CTx (ANDRICH et al., 2010) com massa molecular de 121 kDa, com constituição dimérica, compreendendo subunidades de aproximadamente 65 kDa (MALDI-TOF-MS) com efeitos multifuncionais. Esta toxina possui uma potente atividade hemolítica em eritrócitos lavados de coelhos (EC_{50} 0,46 nM) e semelhante com o efeito da peçonha total (100 μ g/mL), Sp-CTx (1-50 nM) provoca uma resposta bifásica em artérias aórticas pré-contraídas com fenilefrina, induzindo vasorelaxamento seguido de constrição (ANDRICH et al., 2010).

Recentemente, o processo de purificação de Sp-CTx foi otimizado (GOMES et al., 2013) procurando aumentar a recuperação protéica e a atividade biológica. O novo método reduziu o tempo de obtenção da proteína, o que foi essencial devido à natureza lábil dessas toxinas e também para minimizar a hidrólise proteolítica provocada por proteases endógenas presentes na peçonha de *S. plumieri* (CARRIJO et al., 2005). A nova proteína demonstrou induzir a formação de poros em membranas de eritrócitos e apresentou uma massa molecular aparente de 150 kDa (GOMES et al.,

2013), uma proteína com massa maior em relação à Sp-CTX purificada anteriormente por Andrich e seus colaboradores, (2011). É sugerido, como para outras toxinas, que a capacidade de formação de poros é devido ao fato das toxinas citolíticas se associarem formando dímeros, tetrâmeros ou até mesmo maiores níveis de agregação (POH et al., 1991; GARNIER et al., 1995; UEDA et al., 2006).

1.7. Aspectos estruturais dos fatores letais

Citolisinas com estruturas semelhantes isoladas de várias espécies podem possuir funções ofensivas ou defensivas. Os requerimentos estruturais que determinam estas funções têm sido estudados (KINI; EVANS, 1989). As estruturas primárias de várias toxinas de Scorpaeniformes foram deduzidas por experimentos de clonagem e sequenciamento do cDNA a partir do RNA mensageiro (GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006; KIRIAKE; SHIOMI, 2011; KIRIAKE et al., 2013). A estrutura primária que compõe as duas subunidades α e β são similares perfazendo uma homologia de até 50% entre elas.

As estruturas primárias da maioria das citolisinas descritas, apesar da distância filogenética entre os organismos, compartilham sítios catiônicos na estrutura flanqueados por uma região hidrofóbica, características que aparentemente conferem a atividade citolítica (CHEN et al., 1997). As regiões citolíticas podem ocorrer como sítios contínuos, em que os resíduos catiônicos e hidrofóbicos estão localizados próximos uns dos outros ao longo da sequência primária, ou podem ser descontínuos, em que os resíduos relevantes se distribuem separadamente na sequência primária, ficando próximos somente na estrutura tridimensional da cadeia polipeptídica (KINI; EVANS, 1989). Entretanto, os diversos grupos de citolisinas não exibem obrigatoriamente homologia estrutural nem pertencem a uma única família de proteínas, mesmo tendo propriedades funcionais comuns, tal como a habilidade física para ligar a células e lisá-las por mecanismos não-enzimáticos.

A presença de uma região citolítica é fortemente sustentada pela existência de muitos análogos naturais e sintéticos, além de estudos de modificação química de citolisinas. Estudos químicos demonstram que as regiões hidrofóbicas provavelmente

estão envolvidas na ligação com as membranas biológicas, enquanto que resíduos catiônicos atuam como mediadores de interações eletrostáticas com lipossomos e superfícies celulares carregadas negativamente provocando o efeito lítico (KINI; EVANS, 1989).

Dado o número de atividades biológicas mediadas por fatores letais e devido ao tamanho e complexidade dessas proteínas, é razoável assumir que as diversas atividades podem ser mediadas por distintos domínios (YUEN et al., 1995). Uma análise do N-terminal das toxinas de Scorpaeniformes mostra que elas não possuem homologias com sequências de aminoácidos de outras proteínas ou fatores letais depositados no banco de dados. Entretanto, entre as suas subunidades existe uma região C-terminal em comum formado por um domínio, denominado B30.2-like (HENRY et al., 1997), pertencente a superfamília SPRY/B30.2, que provavelmente interage com xantina oxidase endógena mediando assim, atividades vasodiladoras das toxinas.

Domínios SPRY/B30.2 são encontrados em muitas famílias de proteínas envolvidas em uma variedade de funções biológicas. Esses domínios não possuem atividade enzimática demonstrada e a maioria das análises de sua funcionalidade é relacionada com interações proteína-proteína, portanto funcionam como domínios adaptadores aproximando espacialmente proteínas e, assim desempenhando um importante papel nas proteínas que atuam como scaffolds em vias de sinalização, observado principalmente no contexto de processos imunológicos (PERFETTO et al., 2013). Além disso, domínios SPRY/B30.2 mostram excepcional plasticidade de enovelamento e enorme habilidade em envolver diversas especificidades, apesar de não haver conhecimento sobre a razão evolutiva destas modificações.

Apesar de todas as citolisinas realizarem as mesmas funções de lisarem células, elas também podem exibir certo grau de especificidade, que é determinada pela hidrofobicidade da natureza química dada pelos sítios hidrofóbicos e catiônicos, e por fim, a conformação, que podem variar de α -hélices, folhas β a estruturas randômicas (YEW; KHOO, 2000).

A maioria destas citolisinas lisam as células formando poros transmembrânicos em que resíduos de triptofano, catiônicos (arginina e lisina) e grupos tiol livres parecem exercer um papel fundamental nas atividades biológicas (CHEN et al., 1997;

KHOO et al., 1998; YEW; KHOO, 2000). Resíduos de triptofano formam uma superfície hidrofóbica essencial na atividade hemolítica de toxinas formadoras de poros de diversos seres vivos. Foi demonstrado que uma redução no número de resíduos de triptofanos nativos nas sequências de fatores letais prejudica a atividade hemolítica, provavelmente por diminuir o conteúdo de α -hélices abolindo assim a disponibilidade de uma superfície hidrofóbica nas proteínas (YEW; KHOO, 2000).

Toxinas formadoras de poros se ligam a regiões carregadas negativamente de lipídios ou proteínas na membrana celular. Nesta interação, resíduos catiônicos, como arginina e lisina de várias citolisinas são essenciais, intensificando o potencial hemolítico (CHEN et al., 1997). A função de grupos tióis livres já foram relatadas para o efeito lítico, assim, estudos demonstram que modificações das proteínas após tratamento com dithiothreitol (DTT) pode potencializar as atividades hemolíticas e letais de toxinas (KHOO et al., 1998).

Alguns trabalhos relataram que o efeito hemolítico das toxinas, SNTX e TLY é atribuído à formação de poros nas membranas celulares e dois modelos foram propostos para explicar esse efeito provocado por peptídeos líticos contendo α -hélice anfipática. Esses modelos diferem conceitualmente um do outro; no modelo de “barrel-stave”, α -hélices anfipáticas inserem no core hidrofóbico das membranas, monômeros da toxina agregam e, por fim, poros transmembrânicos são formados instabilizando-as. Enquanto que, no modelo de “carpet-like” monômeros de peptídeos ligam na membrana celular por interação eletrostática entre os resíduos catiônicos e a superfície aniônica da célula. Em seguida, os peptídeos rotam e reorientam os resíduos hidrofóbicos no core hidrofóbico da membrana, produzindo um efeito que desintegra a membrana (GHADESSY et al., 1996; CHEN et al., 1997; SHAI, 1999; OUANOUNOU et al., 2002). Apesar das diferenças entre os dois modelos de formação de poros nas membranas, em ambos os casos, são essenciais cargas catiônicas e uma superfície hidrofóbica, como demonstrado por Kini e Evans em 1989 para proteínas citolíticas e por Pasupuleti et al., 2002 para peptídeos derivados de vários organismos.

Estudos adicionais de especificidade, modificações de regiões citolíticas preditas e mutação sítio dirigidas resultam em descobertas de peptídeos antimicrobianos de amplo espectro. Em adição, o estudo de regiões específicas das citolisinas pode provar serem alvos úteis nas terapias anticâncer, das quais podem

atuar como imunotoxinas em células cancerígenas específicas. Portanto, a predição de regiões citolíticas é necessária para o entendimento das relações de estrutura-função de muitas toxinas, contribuindo dessa maneira para as áreas farmacológicas e toxicológicas.

1.8. Lectinas contribuem com envenenamento por peixes peçonhentos

Lectinas isoladas de plantas e animais, incluindo Invertebrados são geralmente definidas como proteínas não-enzimáticas que possuem um importante papel em funções biológicas. Em peixes, lectinas são pouco descritas, embora haja estudos que demonstram que essas moléculas são essenciais no sistema imune inato, uma vez que o sistema imunológico adaptativo não é completamente desenvolvido e eficaz a baixas temperaturas.

A relação que existe entre os peixes e o seu meio ambiente é base de uma variedade de estudos. De uma maneira em geral, peixes possuem a temperatura corporal que é essencialmente a mesma que a água circundante, então, o sistema fisiológico, incluindo funções imunes são influenciadas pela temperatura. Em situações patológicas, peixes dependem de ambos, temperatura e regulação do sistema imune para o crescimento de patógenos (MORVAN et al., 1998). Portanto, peixes dependem em grande parte da imunidade inata para proteção contra patógenos. Lectinas extracelulares solúveis reconhecem hidratos de carbono específicos da superfície de agentes infecciosos e se ligam a eles, conduzindo-os a fagocitose mediada pelo sistema complemento das células.

Em Vertebrados superiores, lectinas são encontradas no soro, plasma, superfícies mucosas e de ovos. Acredita-se que na pele mucosa de muitas espécies de animais marinhos, incluindo peixes exista uma fonte inexplorada lectinas não relatadas, como fish-egg lectinas e lectinas tipo-lily (GALLIANO et al.; 2003; ARASU et al., 2013).

Lectinas contribuem com os sintomas do envenenamento por peixes-escorpião. Shinohara et al (2010), isolaram uma lectina, nomeada karatoxina, dos espinhos dorsais do Scorpaeniforme *Hypodytes rubripinnis* e essa glicoproteína provocou aglutinação de eritrócitos de coelhos e foi efetivamente inibida por D-manose.

Interessantemente, foi observado que essa lectina mostrou atividade citotóxica contra células leucêmicas murinas P388 (NAGASAKA et al., 2009), além disso, mostrou também atividade mitogênica e quimiotática, sugerindo que essa toxina contribui para os efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento, interferindo em processos inflamatórios e imunomodulatórios (SHINOHARA et al., 2010). As lectinas, contudo, atuam em membranas de células endoteliais induzindo ativação e subsequente liberação de fatores quimiotáticos como interleucinas que são capazes de recrutar neutrófilos, promovendo adesão celular por ativação de integrinas (LOPES-FERREIRA et al., 2011).

Em *S. plumieri*, foi descrito que os efeitos locais do envenenamento são também atribuídos à presença da β -lectina plumieribetina isolada do muco da pele dos peixes (EVANGELISTA et al., 2009). Essa proteína (14.4 kDa) atua como um inibidor de integrinas $\alpha 1\beta 1$ semelhante a outras lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose e pufflectina encontradas na pele e intestino do peixe pufferfish/*Fugu* Fish (*Takifugu rubripes*) (TSUTSUI et al., 2003).

Inibidores de integrinas ocorrem naturalmente em muitas peçonhas animais, incluindo serpentes, mediando interações da matriz extracelular, interferindo na integridade tecidual e em várias situações patofisiológicas. Portanto, estudos sugerem que inibidores de integrinas contribuem com os efeitos locais e sistêmicos provocados pelo envenenamento, além de proteger contra eventuais predadores e ajudar na resposta imune inata em respostas contra retrovírus, bactérias e patógenos parasitas (EVANGELISTA et al., 2009).

Lectinas que ligam especificamente carboidratos, como por exemplo, ácido siálico ou galactose, também podem apresentar atividade hemolítica. Uma vez que ocorre a ligação na superfície de eritrócitos, essas lectinas danificam as membranas, conduzindo à lise celular, desempenhando, portanto, um importante papel na defesa contra as infecções bacterianas (KINI; EVANS, 1989).

Em suma, a presença de lectinas em peçonhas de peixes, provavelmente indica que um mecanismo similar evolutivo de proteção foi selecionado para atuar na defesa do próprio, gerando agentes antimicrobianos e citotóxicos, proteínas anti-congelantes e moléculas que afetam o sistema hemostático de Vertebrados. Assim, peçonhas animais são uma rica fonte de lectinas, que constituem substâncias

farmacologicamente ativas com diversas aplicações, incluindo como ferramentas de pesquisa (SHINOHARA et al., 2010).

1.9. Reatividade cruzada entre as toxinas de peixes peçonhentos

Envenenamentos provocados por peixes acarretam em morbidez nas vítimas, além de problemas econômicos e sociais, especialmente para pescadores. Dentre eles, acidentes com peixes das famílias Scorpaenidae e Synanceiidae são os mais severos, podendo até provocar mortes em humanos (HADDAD, 2000).

A hipótese de que as atividades hemolíticas são compartilhadas entre os peixes Scorpaeniformes foi corroborada pela demonstração que esses efeitos foram completamente inativados pelo uso do antiveneno produzido a partir da peçonha do peixe-pedra *Synanceia trachynis* (KREGGER, 1991; POH et al., 1991; GARNIER et al., 1995; COLASANTE et al., 1996).

SFAV (StoneFish AntiVenom) é o único antiveneno produzido e disponível comercialmente a partir da peçonha de *Synanceia trachynis* (Commercial Stonefish Antivenom, SFAV, Melbourne, Austrália), (WHITE, 1995) que é eficaz em neutralizar todos os efeitos clínicos provocados pelos envenenamentos por peixes peçonhentos (SHIOMI et al., 1989; CHURCH; HODGSON, 2002b).

Apesar das propriedades químicas de peixes-escorpião ainda serem pobremente entendidas, é interessante notar que o antiveneno *Synanceia* pode neutralizar não somente as atividades biológicas de toxinas de *Synanceia* sp, mas também de *Dendrochirus*, *Pterois*, *Gymnapistes*, *Scorpaena* e *Inimicus* (SHIOMI et al., 1989; CHURCH; HODGSON, 2001; GOMES et al., 2011; KIRIAKE; SHIOMI, 2011). Essa antigenicidade de reatividade cruzada das toxinas de peixes-pedra com outras toxinas Scorpaeniformes implica inferir que há uma ampla distribuição de toxinas semelhantes nesses grupos de peixes peçonhentos.

A eficiência de neutralização do antiveneno é explicada pela noção que peixes peçonhentos de diferentes gêneros possuem componentes tóxicos similares que preservam identidade antigênica e consequentemente já foi proposto que os efeitos farmacológicos das toxinas diferem somente quantitativamente (CHURCH; HODGSON, 2002b).

Apesar disso, recentemente faz-se necessário desenvolver novos antivenenos específicos, não exclusivamente para minimizar o risco de morte, mas também para oferecer benefícios para a população. Nesse sentido, a produção de antisoros pode no mínimo amenizar os efeitos locais de envenenamentos, como foi observado para o antiveneno de *Thalassophryne nattereri* produzido em coelhos, em que todas as atividades foram neutralizadas, com exceção da edematogênica (LOPES-FERREIRA et al., 1998). Nesse contexto, o estudo de peçonhas e/ou toxinas é útil para o desenvolvimento de novos e antivenenos mais específicos (ou até mesmo anticorpos), capazes de aliviar a maioria dos sintomas provocados pelos envenenamentos.

Objetivos

- **Geral:**

Estudar a diversidade molecular do conteúdo glandular do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* Bloch, 1789, através da análise de cDNA incluindo a produção de uma biblioteca de cDNAs.

- **Específicos:**

- Construir uma biblioteca de cDNAs do peixe-escorpião *S. plumieri*;
- Identificar e caracterizar ESTs (Expressed Sequence Tags) por métodos de screening:
 - randômico,
 - anticorpos primários,
 - sondas radioativas,
 - baseado em PCR convencional;
- Realizar clonagem e análises de fragmentos putativos de toxinas;
- Reconstrução das estruturas primárias de toxinas encontradas em *S. plumieri*;
- Análises bioinformáticas de cDNAs.

Apresentação

Nesta parte, como já foi relatado anteriormente, estão expostos os resultados obtidos durante o doutorado e que geraram dois manuscritos. Inicialmente, há uma descrição dos Materiais e Métodos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho. Em seguida, se apresentam os resultados em ordem cronológica de submissão à publicação científica. Dessa forma, inicio com os resultados obtidos no primeiro artigo, que é a caracterização parcial de ESTs através da construção de uma biblioteca de cDNAs do aparato peçonhento de *S. plumieri*. E, depois são apresentados os resultados obtidos durante a clonagem e análise da estrutura primária de genes que codificam para toxinas encontradas na peçonha de *S. plumieri* em um artigo que ainda será submetido para publicação.

2.0. Materiais

Espécimes jovens de peixes-escorpião *S. plumieri* (10-26 cm) foram coletados de mares rasos da Costa do Espírito Santo, Brasil e mantidos vivos em aquário com água do mar oxigenada. Imediatamente após o sacrifício, os animais foram armazenados na presença de nitrogênio líquido ou gelo seco, até o momento do uso. A captura dos animais foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (The Brazilian Public Agency for Environment Affairs).

Os antisoros produzidos a partir da imunização em coelhos com a fração de lectina e com peçonha total de *S. plumieri*, foram fornecidos de acordo com protocolos padrão pela Fundação Ezequiel Dias R & D (FUNED - Belo Horizonte, Brasil).

Messenger RNA Isolation Kit (Stratagene), ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008, La Jolla, USA), Gigapack® III Gold Packaging Extract (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008), First-strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare Life Sciences), Platinum® *Taq* DNA Polimerase, Brasil (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit with One Shot® TOP10 *E. coli* (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), BigDye™ Terminator v1.1, v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), oligo primers synthesis (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), dNTPs mix (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) e DNA λ Hind III (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), Color Burst™ Electrophoresis Protein Marker (Sigma Chem. Co.) e Protein Marker 6 L Amersham™ (GE Healthcare).

Reagentes sólidos: isotiacianato de guanidina (GITC), agarose, acrilamida e bis-acrilamida (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia), dodecil sulfato de sódio (SDS), glicina, ácido3-(N-morfolino) propanesulfônico (MOPS), sódio dodecil sulfato (SDS), N-lauroylsarcosine (sarkosyl), etileno-diamino-tetracetato dissódico (EDTA) P.A., soroalbumina bovina (BSA, fração IV), glicose, maltose, triptona e extrato de levedura, ágar bacteriológico, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactosídeo), IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo), BCIP (sal dissódico 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato), NBT (cloreto nitro azul de tetrazólio), Ficoll 400, polyvinylpyrrolidone (PVP), dextran

sulfato MW > 500.000 (Sigma Chem. Co.), cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado, persulfato de amônio, acetato de amônio, acetato de sódio, acetato de potássio, citrato de sódio P.A., hidróxido de sódio, Tris-base, fosfato de sódio monobásico e dibásico. Reagentes líquidos: glicerol, Tween 20, Triton X-100, dimetilsulfóxido (DMSO), N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED), 2-β-mercaptoetanol, fenol P.A., fenol:clorofórmio (1:1 v/v), clorofórmio 100% (v/v), álcool isoamílico 100% (v/v), isopropanol 100% (v/v), etanol 70%, 80% e 100% (v/v), ácido clorídrico P.A., ácido acético glacial P.A., formaldeído 37% (v/v), formamida deionizada e dimetilformamida (DMF), fixador e revelador de filmes raios-X, água destilada estéril (dH₂O), água com dietil pirocarbonato (H₂O DEPC), água destilada e deionizada milli-Q estéril, nitrogênio líquido (White Martins do Brasil S/A). Corantes: azul de bromofenol, xileno cyanol FF, azul-brilhante de coomassie G-250, brometo de etídio. Antibióticos: tetraciclina, kanamicina, ampicilina e espectinomicina. Radioativo: dCTP [α -³²P]-6.000 Ci/mmol, 500 μ Ci (PerkinElmer, Gênese). Outros: DNA desnaturado de esperma de salmão, DNase, RNase DNase-free, membranas de nitrocelulose Immobilon em éster de celulose 0,45 μ m HATF (Millipore), membranas de nylon HybondTM-N⁺ (Amersham), membranas de PVDF e filmes auto-radiográficos de raios-x. Os demais reagentes eram de grau analítico.

2.1. Métodos

2.2. Precauções tomadas para a realização dos experimentos

Para prevenir a contaminação por RNases e DNases alguns procedimentos foram adotados para manter o ambiente estéril. Experimentos de Biologia Molecular e de Microbiologia foram realizados em fluxo laminar, que foi sempre limpo com álcool 70% (v/v) e exposto com iluminação ultravioleta por, no mínimo 15 min antes da realização dos experimentos. Ribonucleases A e T1 são largamente comuns e quase indestrutíveis, estas enzimas são produzidas por micróbios e já foram encontradas em superfícies oleosas da pele. Dessa forma, luvas foram utilizadas durante todos os procedimentos de extração, purificação e experimentos de clonagem.

Os materiais descartáveis de plástico, como ponteiros e tubos de microcentrífuga-1.5 mL eram novos e autoclavados por 20 min a 120°C. Outros

utensílios utilizados foram esterelizados com água DEPC - água deionizada autoclavada por 20 min a 120°C após adição de dietil pirocarbonato na concentração final de 0,1% (v/v) e incubação por 12 h. A água DEPC também foi utilizada em todos os experimentos de Biologia Molecular e em praticamente todas as soluções, com exceção daquelas contendo Tris. Materiais de vidro ou de metal foram aquecidos em forno a 250°C por 3-4 h. Certos tipos de materiais de plástico (mais resistentes), como por exemplo, tubos cônicos e pipetas foram rotineiramente lavados com clorofórmio 100% (v/v) para inativar RNases. Quando necessário utensílios como provetas, béckeres, tubos de polipropileno eram tratados com solução de NaOH 10 M, seguido de lavagem com água destilada estéril. Todos os materiais microbiológicos, incluindo meios de cultura foram autoclavados por 20 min a 120°C e as soluções que não podiam ser submetidas à autoclave foram esterelizadas após decantação em filtros de 0,45 µm. As precauções foram realizadas, segundo as recomendações dos fornecedores dos reagentes (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008, InvitrogenTM, Life Technologies, Inc.; GE Healthcare Life Sciences e Applied Biosystems Inc.).

Cuidados foram tomados ao manipular substâncias tóxicas que podem prejudicar a saúde, como fenol, brometo de etídio e ácidos. Ao planejar experimentos que envolvem o uso de radioatividade, foram consideradas as propriedades físico-químicas do isótopo (meia-vida, tipo de emissão e de energia), a forma química da radioatividade e a sua concentração radioativa (atividade específica e total). Na manipulação de material radioativo, sempre foi utilizado luvas, jaleco e óculos de proteção, que também eram utilizados para visualização de experimentos com iluminação ultravioleta. Raios-X e raios gama são ondas eletromagnéticas de comprimentos de onda muito curtas que são emitidas por materiais radioativos, portanto recipientes com radioativo foram protegidos com utensílios feitos de chumbo. O ambiente foi rotineiramente monitorado com o contador de Geiger e a radioatividade foi decaída fazendo limpeza do local com tampão fosfatado e álcool.

Todos esses procedimentos foram realizados para minimizar a contaminação pessoal e do laboratório durante os experimentos.

2.3. Extração do material biológico

Espinhos dorsais, pélvicos e caudais envolvidos com tecido circundante de (5-6) peixes-escorpião *S. plumieri* foram excisados e imediatamente triturados e moídos na presença de nitrogênio líquido até que o material formasse um pó fino. O material resultante foi armazenado na presença de nitrogênio líquido até o início dos protocolos de extração de RNAs descritos a seguir.

2.3.1. Preparação de RNA total dos espinhos de *S. plumieri*

O RNA total foi isolado dos espinhos dorsais, pélvicos e caudais utilizando uma solução caotrópica de isotiocianato de guanidina (GITC), segundo a técnica descrita por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987) com algumas modificações.

Nessa técnica, para cada 100 mg de tecido (após triturar) foram adicionados 1 mL de solução ácida desnaturante formada com a concentração final dos seguintes reagentes: isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM, sarkosyl 0,5% (p/v) e 2-β-mercaptoetanol 0,1 M, pH 4,0. O tecido e a solução desnaturante foram homogeneizados por 30 s com auxílio de homogeneizador de vidro Teflon.

O homogenato resultante foi transferido para tubos de centrífuga de polipropileno estéreis e incubados por 15 min no gelo, após a adição sequencial de 0,1 mL de acetato de sódio, 3M, pH 4,0, 1 mL de fenol saturado em água e 0,2 mL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (49:1). Após adição de cada solução, o homogenato foi misturado minuciosamente por inversão e os tubos foram mantidos no gelo durante todos os passos.

A mistura resultante foi centrifugada a 10.000 X *g* por 20 min a 4°C e o sobrenadante límpido foi cuidadosamente coletado e transferido para novos tubos de centrífuga livres de RNases. As amostras foram então precipitadas com igual adição de isopropanol 100% (v/v) durante 12 h a -20°C. Após a precipitação do RNA total, os tubos foram centrifugados a 4°C, 10.000 X *g* por 30 min, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os precipitados foram ressuspensos com 0,3 mL de solução desnaturante e transferidos para tubos de Eppendorf 1,5-mL livres de RNases.

As amostras foram novamente precipitadas com adição de 0,3 mL de isopropanol 100% (v/v) durante 12 h a -20°C e, depois centrifugadas a 4°C, 10.000 X *g* por 30 min. Em seguida, os pellets foram lavados (3 X) com solução de etanol 75% (v/v), vortexados e incubados por 15 min à temperatura ambiente, para dissolver resíduos de guanidina que contaminam o pellet. Após cada etapa de lavagem com etanol, os tubos de microcentrífuga contendo RNA foram centrifugados a 14.000 rpm e 4°C por 10 min e o sobrenadante foi descartado.

Os pellets de RNA total foram secos em centrifugação à vácuo por 3-5 min e, por fim, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de H₂O DEPC. Alíquotas foram separadas e armazenadas a -80°C, até o momento do uso.

2.3.2. Isolamento de RNA mensageiro das preparações de RNA total de *S. plumieri*

Poli(A)⁺ RNA foi separado do RNA total por cromatografia líquida de afinidade utilizando resina de oligo(dT) celulose e seguindo as recomendações do fornecedor, com algumas adaptações (Messenger RNA Isolation Kit, Stratagene).

Para a realização desse procedimento, inicialmente 2,5 mL de resina oligo(dT)cellulose (0,04 g/mL) foram empacotadas em uma seringa estéril com lã de sílica na extremidade inferior. A coluna foi equilibrada com 25 mL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM), mantendo um fluxo constante de ~ 1 gota a cada 2 s.

Antes da purificação, as amostras de RNA total foram aquecidas por 10 min a 65°C e depois colocadas no gelo. Em seguida, amostras contendo aproximadamente 0,1-0,15 mg (< 400 µL) de RNA foram aplicadas na coluna e tubos de microcentrífuga-1,5 mL estéreis foram utilizados para recuperar o eluído. As amostras de RNA total foram então reaplicadas na coluna por 2 X para garantir que a maior parte das moléculas poliadeniladas liguassem na resina.

Prosseguindo, foram aplicados sequencialmente na coluna: 2 X de 200 µL de tampão com alta concentração de sal (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M) e 3 X de 200 µL de tampão com baixa concentração de sal (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5,

EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M). Em seguida, o RNA mensageiro foi eluído utilizando quatro alíquotas de tampão de eluição (400 μ L) pré-aquecidos a 65°C e, por fim, o eluato foi recuperado e imediatamente preparado para precipitação.

Para cada amostra de mRNA foram adicionados: 40 μ L de acetato de sódio 3M, 1 μ L de glicogênio (20 mg/mL) e 1,1 mL de etanol 100% (v/v). Cada tubo foi vortexado e a precipitação do mRNA foi realizada durante 12 h a -20°C.

As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm e 4°C por 30 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, os pellets de mRNA foram secos por centrifugação a vácuo por 5 min e, por fim, as amostras foram armazenadas a -80°C, até o momento do uso. Alíquotas para experimentos imediatos foram feitas com adição de 20 μ L de H₂O DEPC e aquecimento a 65°C por 5 min para garantir que os mRNA fossem completamente ressuspensos.

2.3.3. Dosagem de ácidos nucleicos

A quantificação de ácidos nucleicos (RNA total, mRNA, cDNAs e oligonucleotídeos de primers) foram realizadas em espectrofotômetro [®]NanoDropND-1000 com leituras em absorbâncias (A) de 260 e 280 nm. Foi considerado, para fator de conversão, segundo o protocolo descrito por Sambrook e Russell, 2001, que as densidades ópticas (D.O.) de 1,0 a 260 nm correspondem às concentrações de 40 μ g/mL, 50 μ g/mL e 33 μ g/mL para RNA, DNA dupla fita e DNA simples-fita, respectivamente. Os resultados das dosagens de RNA foram expressas em μ g/g tecido isolado do aparato peçonhento de *S. plumieri*.

As razões entre as leituras A_{260}/A_{280} foram estimadas para verificar a pureza das preparações das amostras. As amostras foram consideradas puras quando as razões apresentavam valores entre 1,8 e 2,0.

2.3.4. Eletroforese em gel de agarose (MOPS:formaldeído)

Para avaliar a integridade e estabilidade das moléculas de RNA total, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) sob condições

desnaturantes na presença de tampão MOPS:formaldeído, segundo a técnica descrita por Sambrook e Russell, 2001.

Aproximadamente 0,5 g de agarose foram aquecidas com 42,5 mL de água DEPC e após resfriada a solução a 55°C, adicionou-se 5 mL de tampão MOPS 10 X, pH 7,0 (MOPS 200 mM, acetato de sódio 50 mM, EDTA 10 mM) e 2,7 mL de formaldeído 37% (v/v). Em seguida, misturou-se bem e rapidamente o gel foi transferido para o aparato de eletroforese até solidificar-se.

Para esta técnica, 2 µg (v = 10 µL) de RNA total foram inicialmente desnaturados por aquecimento a 65°C por 10 min e imediatamente refrigeradas no gelo por no mínimo 5 min antes de serem preparadas para o gel. Em seguida, para cada amostra foram adicionados 10 µL de tampão loading [48% de formamida deionizada, 18% de formaldeído 37% (v/v) e 35% de tampão loading dye (160 µL de tampão MOPS 10 X, 100 µL H₂O DEPC, 100 µL de brometo de etídio 10 mg/mL, 80 µL de glicerol e 80 µL de azul de bromofenol saturado em água)].

Para comparar a integridade dos perfis ribossomais e a distribuição da população das moléculas de RNA de *S. plumieri*, foram utilizados como padrões de peso molecular as preparações de RNA total isolado de fígado de *Rattus norvegicus* e tRNA isolado de *E. coli*.

Seguindo a preparação das amostras de RNA, elas foram aquecidas a 65°C por 5 min e aplicadas no gel solidificado imerso com tampão MOPS 1 X. A eletroforese foi carregada em um aparato horizontal com um fluxo de voltagem constante de 5 V/cm de gel, até o azul de bromofenol atingir ¾ do gel. Após a corrida, o gel foi lavado por 30 min em solução de sulfato de amônio 0,5 M para retirar o excesso de formaldeído e, em seguida, foi examinado com iluminação ultravioleta 312 nm (UV). Para documentação dos géis foi utilizado câmera fotográfica digital Canon Power Shot G11, 10 Mega Pixels.

A estabilidade do RNA total e verificação da presença de nucleases foram realizadas com incubação das amostras por 2 h a 37°C e, depois comparadas com amostras de RNAs não-incubadas e armazenadas a -80°C. A integridade do material foi confirmada em gel 1% (p/v) de agarose Mops:formaldeído, como descrito anteriormente.

2.4. Construção e caracterização da biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*

A Biblioteca de cDNAs foi construída com mRNA isolado do aparato peçonhento de *S. plumieri* e utilizando o kit ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008), seguindo o manual de instruções do fornecedor.

2.4.1. Preparação do estoque de bactérias hospedeiras

Células de bactérias foram repicadas em placas de Petri contendo LB ágar com antibiótico apropriado (Tabela 3) a partir do estoque original fornecido pela Stratagene. As placas foram invertidas e incubadas por 12 h na estufa a 37°C. Em seguida, uma colônia individualizada de cada cepa foi isolada e inoculada em um tubo cônico estéril contendo 10 mL de LB líquido com suplementos e apropriado antibiótico.

Os tubos foram colocados em shaking a 37°C até que as bactérias atingissem a fase log tardia. Após isso, foram adicionados 4,5 mL de glicerol-LB líquido (preparado a partir da mistura de 5 mL de glicerol + 5 mL de meio líquido LB) e os tubos foram agitados e aliquotados em tubos de microcentrífuga-1,5 mL estéreis (1 mL/tubo). Alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Tabela 3: Meios de cultura recomendados e utilizados para a construção da biblioteca de bacteriófagos ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning.

Bactéria	LB-ágar ^a	LB-líquido ^b	Ágar/top ágar ^c
SOLR TM	LB-KANAMICINA	LB com suplementos	-
	LB-AMPICILINA		-
VSC257 ^d	LB	LB com suplementos	NZY ^e
XL1-Blue MRF'	LB-TETRACICLINA	LB com suplementos	NZY ^e

^aLB-ágar: 10 g NaCl, 10 g tryptona, 5 g extrato de levedura, 20 g ágar, volume final 1 L, pH 7,0.

^bLB líquido: 10 g NaCl, 10 g tryptona, 5 g extrato de levedura, volume final 1 L, pH 7,0, com suplementos (0,2 % maltose (w/v) e 10 mM de MgSO₄.7H₂O).

^cPlacas de ágar/top ágar usados para a formação de placas de bacteriófagos.

^dPara uso somente com empacotamento de DNA controle lambda tipo selvagem λcl857 *Sam7* com o extrato Gigapack III Gold.

^eNZY ágar: 5 g NaCl, 2 g MgSO₄.7H₂O, 5 g extrato de levedura, 10 g NZ amina, 15 g ágar, volume final 1 L, pH 7,5. Top ágar: NZY ágar com adição de 0,7% agarose (p/v).

2.4.2. Preparação de bactérias hospedeiras para a manipulação com fagos

Culturas bacterianas para a manipulação com fagos iniciaram com o isolamento de uma colônia de células que foram crescidas no meio seletivo contendo ágar (XL1-Blue MRF', VCS257 ou SOLR). Colônias individualizadas de cada linhagem foram transferidas separadamente para tubos cônicos estéreis contendo 10 mL de LB com suplementos (0,2 % maltose (w/v) e 10 mM de MgSO_4). Os tubos foram incubados com shaking a 37°C até as células atingirem um crescimento com D.O.₆₀₀ de 1,0. As células foram então centrifugadas a 1.000 X g por 10 min e depois ressuspensas em 10 mL de MgSO_4 10 mM e armazenadas a 4°C. Antes do uso, as células foram diluídas para D.O.₆₀₀ de 0,5 com MgSO_4 10 mM. As células bacterianas preparadas dessa maneira foram utilizadas por todas as manipulações com fagos. Altas eficiências foram obtidas produzindo células frescas preparadas previamente ao uso.

2.4.3. Titulação e amplificação de fagos Helper ExAssist

O helper ExAssist juntamente com a linhagem de células SOLR são fornecidos para a realização do procedimento de excisão *"in vivo"*. O vetor Uni-ZAP XR é designado para permitir uma simples, eficiente excisão e recircularização de algum inserto clonado dentro do vetor lambda para formar um fagemídeo clonado.

Para titular o helper ExAssist, inicialmente células XL1-Blue MRF' foram preparadas como descrito anteriormente. Os fagos helper ExAssist foram diluídos (10^{-4} – 10^{-7}) em tampão SM (5,8 g NaCl, 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mL Tris-HCl 1 M pH 7,5, 5 mL gelatina 2% (p/v), volume final 1 L) e 1 µL de cada diluição foi combinado com 200 µL de células XL1-Blue MRF' (D.O.₆₀₀ = 0,5). Em seguida, os fagos helper e as células XL1-Blue MRF' foram incubados por 15 min a 37°C, para permitir que os fagos atacassem as células.

Após a incubação, foram adicionados sobre a mistura, 3 mL de NZY top ágar, aquecidos e resfriados a ~ 48°C e, imediatamente plaqueados em placas de NZY ágar, secas e pré-aquecidas. As placas foram invertidas e incubadas em estufa por 12 h a

37°C. Para determinar o título (pfu/mL), foi utilizada a equação (1), em que o volume plaqueado se refere ao volume da solução de fagos helper adicionados para as células.

$$\frac{\text{Número de placas (pfu)} \times \text{fator de diluição} \times 1.000 (\mu\text{L/mL})}{\text{Volume plaqueado} (\mu\text{L})} \quad (1)$$

No caso de o título estiver diminuído ($< 1,0 \times 10^{10}$), o helper foi preparado para amplificação. Nesse protocolo, uma colônia de células XL1-Blue MRF' foi transferida para um tubo cônico estéril contendo 10 mL de LB com suplementos e o tubo foi incubado com shaking a 37°C até que as células atingissem um crescimento com D.O.₆₀₀ de 0,3 ($2,5 \times 10^8$ células/mL). Em seguida, foi adicionado o helper ExAssist em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20:1 (razão de fagos/células) e foi incubado com shaking a 37°C por 8 h. Após a incubação, o tubo cônico foi aquecido a 65°C por 15 min e centrifugado a 1.000 X g por 10 min à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo estéril e foi adicionado DMSO em uma concentração final de 7% (v/v). Após a amplificação do helper, o título do sobrenadante foi determinado como descrito anteriormente. Para os experimentos com os fagos helper, títulos do ExAssist entre $7,5 \times 10^{10}$ e $1,0 \times 10^{12}$ pfu/mL foram considerados viáveis. Alíquotas de 0,5 mL/tubo foram separadas e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

2.4.4. Síntese ZAP-cDNA

O mRNA foi reversamente transcrito com StrataScript RT para produzir a primeira fita de cDNA utilizando um linker-primer híbrido de oligo(dT) que contém um sítio de restrição *Xho* I e 5-metil dCTP. A primeira fita completa é formada por DNA hemimetilado, o qual protege o cDNA das enzimas de restrições usadas nos passos subsequentes de clonagem.

Em um tubo de microcentrífuga livre de RNase, foram adicionados na ordem descrita, os seguintes reagentes: 5 µL de 10 X tampão primeira fita, 3 µL da mistura de nucleotídeos metilados, 2 µL de linker-primer (1,4 µg/µL), 13 µL de H₂O DEPC, 1 µL de Inibidor Ribonuclease bloqueio de RNase (40 U/µL).

A reação foi misturada e, em seguida, foram adicionados 24,5 μL de poli(A)⁺ RNA (~ 5 μg) obtido de *S. plumieri*. Após misturar gentilmente, o tubo foi mantido à temperatura ambiente por 10 min, para permitir que o primer anele nas moléculas poliadeniladas. Prosseguindo, foram adicionados e misturados gentilmente na reação, 1,5 μL de StrataScript RT (50 U/ μL). A reação de síntese da primeira fita foi colocada em banho-maria a 42°C por 1 h.

A reação cDNA de primeira fita foi colocada no gelo e para a síntese da segunda fita foram adicionados no tubo e na ordem descrita os seguintes reagentes: 20 μL de 10 X tampão segunda fita, 6 μL da mistura de dNTP segunda fita, 116 μL H₂O destilada estéril, 2 μL de RNase H (1,5 U/ μL) e 11 μL de DNA polimerase I (9 U/ μL). A mistura foi gentilmente vortexada e foi realizado spin durante 2 seg em uma microcentrífuga. Em seguida, a reação de segunda fita foi incubada em banho-maria a 16°C por 2,5 h.

Para formar um cDNA com extremidades cegas (blunt-ended), foram adicionados após a síntese da segunda fita: 23 μL da mistura de dNTP blunting e 2 μL DNA polimerase *Pfu* clonada (2,5 U/ μL). Após rapidamente vortexar a reação e realizar um spin, a reação foi incubada em banho-seco a 72°C por 30 min.

A reação final foi fenolizada com a adição de 200 μL de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v). A mistura foi vortexada e após realizar um spin máximo (14.000 rpm) por 2 min à temperatura ambiente, a fase aquosa que contém o cDNA foi transferida para um novo tubo e nele foram adicionados 200 μL de clorofórmio 100% (v/v). Em seguida, a mistura foi novamente vortexada e após realizar um spin máximo por 2 min à temperatura ambiente, a fase aquosa que contém o cDNA foi transferida para um novo tubo. A precipitação do cDNA ocorreu por 12 h a -20°C com a adição de 20 μL de acetato de sódio 3 M e 400 μL de etanol 100% (v/v).

Em seguida, o cDNA foi centrifugado a 14.000 rpm em uma microcentrífuga refrigerada a 4°C por 60 min. Após descartar o sobrenadante, o pellet de cDNA foi lavado com 500 μL de etanol 70% (v/v) e foi feito um spin máximo (14.000 rpm) por 2 min. O etanol foi aspirado e o pellet foi seco por centrifugação a vácuo.

Posteriormente, o pellet de cDNA foi ressuspendido em 9 μL de adaptadores *EcoR* I e incubados a 4°C por 30 min. Em seguida, foram adicionados os seguintes componentes na reação: 1 μL de 10 X tampão ligase, 1 μL de rATP 10 mM e 1 μL de T4

DNA ligase (4 U/ μ L). O tubo foi incubado por 12 h em banho-maria a 8°C e na manhã seguinte, a ligase foi inativada por aquecimento a 70°C por 30 min.

As extremidades adaptadoras *EcoR* I foram fosforiladas por adicionar os seguintes componentes: 1 μ L de 10 X tampão ligase, 2 μ L de rATP 10 mM, 5 μ L de água estéril e 2 μ L de T4 polinucleotídeo kinase (5 U/ μ L). A reação foi incubada por 30 min a 37°C e, em seguida, a kinase foi inativada por aquecimento em banho-seco a 70°C por 30 min.

Por fim, o cDNA foi digerido com 28 μ L de tampão suplemento *Xho* I e 3 μ L de enzima de restrição *Xho* I (40 U/ μ L). A reação foi incubada a 37°C por 1,5 h e, depois foram adicionados 5 μ L de 10 X tampão STE (NaCl 1 M, Tris-HCl 200 mM pH 7,5, EDTA 100 mM) e 125 μ L de etanol 100% (v/v). A reação foi precipitada durante 12 h a -20°C.

Seguindo a precipitação, o cDNA foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 60 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet seco completamente por centrifugação a vácuo e ressuspendido em 14 μ L de tampão STE 1 X. As amostras de cDNAs foram fracionadas em uma coluna de gel filtração contendo resina Sepharose CL-2B, como descrito a seguir.

2.4.5. Purificação dos cDNAs em resina Sepharose® CL-2B

O cDNA modificado foi purificado em coluna de gel filtração contendo Sepharose® CL-2B, de acordo com as instruções do fornecedor, com a intenção de selecionar populações de cDNAs de maior tamanho para a subsequente ligação no vetor Uni-ZAP XR. Inicialmente, a resina foi empacotada na presença de tampão STE 1 X em uma pipeta de vidro estéril de 1-mL graduada, contendo lã de vidro na extremidade inferior. Uma vez que a resina se encontrou com suspensão uniforme dentro da pipeta de vidro, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão STE 1 X.

Antes do fracionamento, foram adicionados na amostra de cDNAs 3,5 μ L de loading dye fornecidos pelo kit. Após a adição da amostra na coluna, gentilmente foi adicionado tampão STE 1 X durante todo o procedimento. As frações foram coletadas (3 gotas/tubo $\sim$ 100 μ L) assim que o loading dye atingisse a graduação .2 da pipeta e as coletas foram realizadas até o loading dye começar a sair da coluna. Um mínimo de 12 frações foram coletadas durante o fracionamento.

Em seguida, as frações coletadas foram desproteinizadas com adição de igual volume das amostras de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v). A mistura foi vortexada e após realizar um spin máximo (14.000 rpm) por 2 min à temperatura ambiente, a fase aquosa que contém o cDNA foi transferida para novos tubos e neles foram adicionados um igual volume de clorofórmio 100% (v/v). Após o vórtex e o spin máximo por 2 min à temperatura ambiente, a fase aquosa que contém o cDNA foi transferida para um novo tubo. As amostras foram precipitadas durante 12 h a -20°C com a adição de 2 X de etanol 100% (v/v) em relação ao volume inicial da amostra.

Seguindo a precipitação, o cDNA foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 60 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 200 µL de etanol 80% (v/v) e realizou-se um spin máximo (14.000 rpm) por 2 min à temperatura ambiente. O etanol foi aspirado das frações e o pellet foi seco por centrifugação a vácuo. As frações de cDNAs foram dissolvidas em 7 µL de H₂O estéril e, enfim foram submetidas a dosagem no espectrofotômetro® NanoDropND-1000. Frações com populações de cDNAs foram juntadas e concentradas para a ligação no vetor Uni-ZAP XR.

2.4.6. Ligação dos insertos de cDNAs no vetor Uni-ZAP XR

O vetor Uni-ZAP XR (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008) foi utilizado para a clonagem dos cDNAs de *S. plumieri*. O vetor Uni-ZAP XR é duplamente digerido com *EcoR* I e *Xho* I para acomodar insertos de DNA que podem atingir até 10 kb de extensão. Nesse sistema de clonagem, o Uni-ZAP XR permite a excisão “*in vivo*” do fagemídeo pBluescript® (Figura 6), permitindo que os clones sejam caracterizados em sistema plasmidial. O fagemídeo contém 21 sítios únicos de clonagem flanqueados pelos promotores T4 e T7, além de possuir 6 diferentes sítios de ligação de primers para o sequenciamento do DNA.

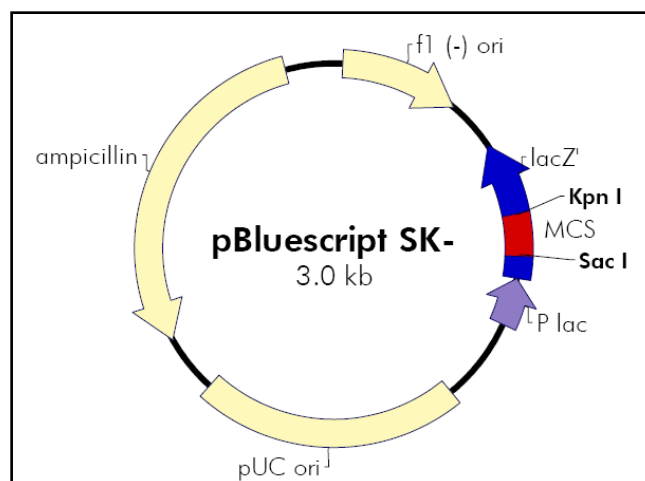


Figura 6: Mapa circular do fagemídeo pBluescript SK (-). A sequência completa e a lista dos sítios de restrição estão disponíveis em: www.stratagene.com ou no banco de dados GenBank (Acesso: X52324).

Uma vez selecionado as frações de cDNAs de maior tamanho, ~ 375 ng (1.5 μ L) foram misturados com 0,5 μ L de tampão ligase 10 X, 0,5 μ L de rATP 10 mM pH 7,5, 1 μ L de vetor pré-digerido Uni-ZAP XR (1 μ g), 1 μ L de H₂O estéril e 0,5 μ L de T4 DNA ligase (4 U/ μ L). A reação foi incubada em banho-maria a 12°C durante 12 h. Após a reação de ligação ser completada, ela foi empacotada utilizando o extrato Gigapack III, como descrito a seguir.

2.4.7. Reação de empacotamento

A biblioteca lambda foi clonada em um sistema de alta eficiência utilizando o Gigapack® III Gold Packaging Extract (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008). O extrato de empacotamento foi removido do freezer -80°C e o DNA ligado ($v = 4 \mu$ L, ~ 1 μ g) foi imediatamente adicionado ao extrato para gerar a biblioteca primária de fagos.

A reação foi misturada por inversão, evitando a formação de bolhas, em seguida, realizou-se um spin por 3-5 s e o tubo foi incubado em banho-maria a 22°C por 2 h. Terminada a reação, foram adicionados 500 μ L de tampão SM e 20 μ L de clorofórmio 100% (v/v) e misturou-se gentilmente. Após um breve spin, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e nele continham os fagos para a realização da titulação da biblioteca, que foi determinada após infecção em linhagens

de células *E. coli* XL1-Blue MRF', seguido de plaqueamento em placas NZY/NZY top ágar.

Paralelamente para testar a eficiência do extrato de empacotamento, foi realizada a reação com 1 µL (~ 0,2 µg) de DNA lambda controle λ cl857 *Sam7* tipo selvagem e o procedimento foi realizado como descrito anteriormente.

Os fagos empacotados com os cDNAs da biblioteca e aqueles obtidos pelo DNA controle foram diluídos em várias proporções (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em tampão SM e o título da reação de empacotamento foi realizado como descrito no item 2.4.2 para a preparação das células e 2.4.3 para a titulação dos fagos, sendo que as células XL1-Blue MRF' foram combinadas com as diluições da biblioteca primária e as células VCS257 foram combinadas com o DNA ligado controle. O número de placas foi contado e o título determinado em (pfu/mL). A eficiência do empacotamento foi calculada utilizando a seguinte equação (2):

$$\frac{\text{Número de placas} \times \text{fator de diluição} \times \text{Volume total empacotado}}{\text{Número total de } \mu\text{g empacotados} \times \text{Volume plaqueado} (\mu\text{L})} \quad (2)$$

Esses procedimentos nos permitiram avaliar a eficiência da reação de empacotamento, bem como a determinação do título da biblioteca primária de fagos.

2.4.8. Amplificação da biblioteca de cDNAs

Bibliotecas primárias são altamente instáveis, portanto a amplificação é recomendada imediatamente após o empacotamento das partículas de fagos. Para isto, células hospedeiras da linhagem *E. coli* XL1-Blue MRF' foram preparadas como descrito no item 2.4.2.: "Preparação de bactérias hospedeiras para a manipulação com fagos".

Alíquotas da mistura do empacotamento da biblioteca de fagos contendo aproximadamente 5×10^4 pfu de bacteriófagos foram combinadas com 600 µl de células XLI-Blue MRF' (D.O.₆₀₀ de 0,5) em tubos de polipropileno autoclavados. Os tubos contendo os fagos e as células hospedeiras foram incubados por 15 min a 37°C para permitir que os fagos ataquem as células.

Após a incubação, foram adicionados 6,5 mL de NZY top ágar, aquecido e resfriado a 48°C e a mistura foi plaqueada em placas de Petri 150-mm contendo meio NZY ágar. As placas permaneceram por 10 min à temperatura ambiente para que o NZY top ágar secasse e depois, as placas foram invertidas e incubadas na estufa a 37°C por 5-6 h ou até que as placas de lise atingissem tamanho máximo de 2 mm. As placas lisadas foram revestidas com 8 mL de tampão SM e armazenadas a 4°C durante 12 h para que os fagos se diluíssem no tampão. No dia seguinte, a suspensão de bacteriófagos da placa foi recuperada e transferida para tubos estéreis de polipropileno e foi adicionado clorofórmio para uma concentração final de 5% (v/v). Os tubos foram misturados e incubados por 15 min a temperatura ambiente e depois, os restos celulares foram removidos por centrifugação por 10 min a 500 X *g*.

O sobrenadante límpido foi recuperado e transferido para novos tubos de polipropileno. A biblioteca amplificada foi separada em alíquotas após a adição de clorofórmio em uma concentração final de 0,3% (v/v) e DMSO 7% (v/v). Alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento do uso. O título da biblioteca amplificada foi determinado, como descrito no item 2.4.3.: “Titulação e amplificação de fagos Helper ExAssist” e para isso, foi assumido que a biblioteca continha $\sim 10^9$ – 10^{11} pfus/mL, como recomendado pelo fornecedor.

2.4.9. Excisão “*in vivo*” do fagemídeo pBluescript® do vetor Uni-ZAP XR

Os fagos helper ExAssist com linhagens de células SOLR são designados a permitir uma eficiente excisão do fagemídeo pBluescript® do vetor Uni-ZAP XR. Para isto, foi realizado o protocolo de excisão em massa, como descrito no manual de instruções da Stratagene.

Células das linhagens XL1-Blue MRF' e SOLR foram preparadas como descrito no item 2.4.2: “Preparação de bactérias hospedeiras para a manipulação com fagos”, sendo que a suspensão de células foram diluídas para uma D.O.₆₀₀ de 1,0 ($\sim 8 \times 10^8$ células/mL) em solução de 10 mM de MgSO₄.

Em um tubo cônico estéril de 50-mL, foram misturados uma fração da biblioteca contendo um volume de 100 X maior que o tamanho da biblioteca primária com 10 X o volume de células XL1-Blue MRF' (MOI de 1:10 fagos da biblioteca/células)

e 100 X de fagos helper ExAssist (MOI de 10:1 fagos helper/células XL1-Blue MRF'). O tubo cônico contendo a mistura dos fagos da biblioteca, as células XL1-Blue MRF' e o helper ExAssist nas proporções mencionadas foram incubados a 37°C por 15 min. Em seguida, foram adicionados até 20 mL de LB com suplementos e, em seguida, o tubo foi incubado com shaking por 2-2,5 h a 37°C. Após a incubação, o tubo foi então aquecido a 65-70°C por 20 min e centrifugado a 1.000 X *g* por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo os fagemídeos pBluescript® foram transferidos para novos tubos cônicos estéreis.

Para titular os fagemídeos excisados, uma alíquota de 1 µL do sobrenadante obtido foi combinado com 200 µL de células SOLR (D.O.₆₀₀ de 1,0) e a mistura foi incubada a 37°C por 15 min. Em seguida, foram realizadas diluições da mistura de células em solução de 10 mM MgSO₄ que foram posteriormente plaqueadas em placas de LB-ágar-ampicilina (100 µg/mL). As placas foram invertidas e incubadas na estufa a 37°C por 12 h e depois as colônias foram selecionadas através de métodos tradicionais de screening e o DNA plasmidial foi isolado com técnicas de mini-preparações, como descrito a seguir.

2.4.10. Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes (Mini-preparações)

Os clones obtidos da excisão e crescidos em células SOLR ou obtidos por outros métodos de clonagem foram selecionados e coletados individualmente, crescidos por 12 h a 37°C com shaking em 5 mL de meio líquido LB contendo antibiótico apropriado, no caso a ampicilina (100 µg/mL) para os clones originados da biblioteca de cDNAs e espectinomicina (10 mg/mL) para os clones obtidos a partir da clonagem utilizando o kit pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning with One Shot® TOP10 *E. coli* (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.). Foi realizado o protocolo de extração em baixa escala de plasmídeos (Mini-preps: mini-preparações) de acordo com o método de lise alcalina-SDS descrito por Sambrook e Russell, 2001.

Os tubos contendo os clones foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm e o meio líquido foi removido por aspiração, deixando assim o pellet secar. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,5 e

EDTA 10 mM pH 8,0) e os tubos de microcentrífuga contendo as células foram dissolvidos com auxílio do vortex. Ao homogenato resultante foram adicionados 200 µL de solução II (NaOH 0,2 M e 1% (p/v) de SDS) e os tubos foram misturados por inversão e depois incubados por 5 min no gelo. Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução III (acetato de potássio 5 M pH 4,6) e os tubos foram homogeneizados novamente por inversão, incubados no gelo por 5 min e, por fim, centrifugados por 5 min a 14.000 rpm e temperatura ambiente. O sobrenadante límpido contendo os plasmídeos foi coletado e transferido para tubos estéreis de microcentrífuga-1,5 mL.

O DNA plasmidial resultante foi precipitado por 2 h a -20°C com 2 X de volume de etanol 100% (v/v) e centrifugados a 10.000 X *g*, a 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspendido em água mili-Q autoclavada e tratado por 2 h com RNase (20 µg/mL) em banho-maria a 37°C.

Com a intenção de eliminar proteínas das preparações, as amostras foram fenolizadas. Para isto, para cada amostra foram adicionados o dobro de volume de solução contendo fenol:clorofórmio 1:1 (v/v), as quais foram vortexadas e centrifugadas 14.000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga-1,5 mL, e foram adicionados igual volume de clorofórmio 100% (v/v), vortexados e centrifugados por 2 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi novamente transferido para outros tubos estéreis de microcentrífuga-1,5 mL e o DNA plasmidial foi precipitado com igual volume de etanol 100% (v/v) durante 2 h a -20°C e, em seguida, centrifugados a 10.000 X *g*, a 4°C por 15 min. Prosseguindo, o pellet foi lavado 2 X com etanol 75% (v/v), centrifugados a 10.000 X *g*, a 4°C por 15 min. Por fim, o pellet foi seco por centrifugação a vácuo e ressuspendido em 50 µL de água DEPC. O perfil do DNA plasmidial foi visualizado em gel de agarose 1%, como descrito posteriormente no item 2.9.2.: “Análise e quantificação dos produtos de PCR” e a dosagem do DNA foi estimada no espectrofotômetro [®]NanoDropND-1000 com leituras em absorbâncias de 260 nm.

2.4.11. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição *EcoR* I

Para confirmar a presença de inserto nos plasmídeos isolados nas mini-preparações, uma alíquota do DNA plasmidial (~ 200 ng) foi digerida com

endonuclease de restrição *EcoR* I (1 U) e em presença de tampão apropriado da enzima, contendo: Tris-HCl 0,1 M pH 7,4/NaCl 50 mM/MgCl₂ 5 mM com 0,025% (p/v) de Triton X-100 e 100 µg/mL de BSA. As amostras foram incubadas por 12 h a 37°C e, em seguida foram submetidas em eletrofores em gel de agarose 1%. Foram considerados clones com presença de inserto, aqueles que após a digestão, o perfil linearizado do DNA no gel apresentou bandas superiores a 3 kb, que corresponde ao tamanho do vetor não-clonado. Clones recombinantes foram preparados para a reação de sequenciamento.

2.5. Screening da biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*

Nesse trabalho, foram adotados diferentes métodos de screening da biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*. Foram realizados protocolos de screening randômico (seleção com IPTG e X-gal), screening com anticorpos primários produzidos do peixe-escorpião (fração de lectina e fração da peçonha total), screening baseado em PCR e, por fim, screening com radioativo dCTP [α -³²P].

2.6. Screening randômico da biblioteca de cDNAs

Para identificar clones recombinantes obtidos da biblioteca de cDNAs foram realizados testes de seleção de colônias por cor azul/branco. Segundo essa técnica, quando o cDNA está presente no vetor Uni-ZAP XR, a expressão do gene *lacZ* é interrompida e placas brancas são produzidas. Em contraste, sem a presença de inserto no vetor o amino-terminal da β -galactosidase é expresso e não-recombinantes podem ser visualizados pela presença de colônias azuis.

O background foi determinado na biblioteca primária e na biblioteca amplificada somente para determinar a razão de recombinantes e não-recombinantes. Após o processo de excisão da biblioteca e infecção dos fagemídeos em células SOLR para obtenção de colônias em sistema plasmidial, as colônias brancas foram selecionadas em detrimento das colônias azuis. Durante esse procedimento, placas NZY ágar/top ágar (para uso em manipulação com fagos) ou placas LB-ágar-ampicilina

100 µg/mL (para uso com a biblioteca em células SOLR), ambas contendo IPTG 2,5 mM e X-gal (50 mg/mL em DMF 70% (v/v)) foram utilizadas para plaquear a biblioteca.

O plaqueamento dos fagos ocorreu como descrito no item 2.4.3.: “Titulação e amplificação de fagos Helper ExAssist” e o plaqueamento da biblioteca em sistema plasmidial como descrito no item 2.4.9.: “Excisão *in vivo*” do fagemídeo pBluescript® do vetor Uni-ZAP XR”. Colônias foram visíveis após incubação por 12 h em estufa a 37°C. Nessa técnica, as colônias brancas foram selecionadas randomicamente da biblioteca no sistema plasmidial e preparadas para isolamento do DNA, como descrito no item 2.4.10.: “Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes (Mini-preparações)”. A presença de inserto nos clones foi confirmada após digestão com enzima *EcoR* I, como descrito no item 2.4.11.: “Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição *EcoR* I”.

2.7. Transferência da biblioteca de cDNAs para filtros de membranas

Para realização do screening com anticorpos e com o radioativo, inicialmente a biblioteca foi transferida para filtros de membranas de nitrocelulose ou de nylon Hybond-N⁺, segundo a técnica descrita por Ausubel, 1995, com algumas modificações.

Para isso, após titular a biblioteca de fagemídeos, como descrito no item 2.4.9.: “Excisão *in vivo*” do fagemídeo pBluescript® do vetor Uni-ZAP XR”, a diluição contendo 1.000 colônias foram semeadas em placas de cultura 150-mm e cultivadas durante 3 h na estufa a 37°C. Em seguida, foi colocada cuidadosamente em cada placa uma membrana previamente embebida ou não com 10 mM de IPTG e que foi depois marcada com buracos feitos com ponteiras entre a membrana e o ágar da placa, para obter uma orientação da membrana com a placa-mãe. As placas foram então novamente incubadas por 3 h a 37°C. Após a incubação, as réplicas de colônias nas membranas foram removidas da placa-mãe e colocadas para secar a temperatura ambiente.

Na tentativa de preservar melhor as colônias da placa-mãe após a transferência, foi realizada uma alternativa para transferir a biblioteca para as membranas, conforme Sambrook e Russell, 2001, com modificações. Nesse modo, inicialmente a biblioteca titulada foi semeada e as placas de cultura foram cultivadas

por 12 h a 37°C. No dia seguinte, as placas foram armazenadas por 1 h a 4°C, antes de aplicar os filtros. Os filtros de membranas foram colocados cuidadosamente na placa, marcas de orientação assimétrica foram feitas e os filtros removidos da placa após 5 min de transferência. As membranas foram então colocadas para secar à temperatura ambiente e armazenadas até o momento do uso.

2.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Proteínas dos espinhos dorsais, pélvicos e caudais de *S. plumieri* foram obtidas através de extração de um pool de acordo com o método batch, previamente descrito por Schaeffer et al., 1971. As amostras de espinhos triturados foram dissolvidas em H₂O destilada a 4°C (0,1 mg de tecido/0,1 mL de H₂O) e a solução foi centrifugada a 4.000 rpm, 4°C por 10 min. O sobrenadante límpido foi recuperado e a concentração de proteínas foi determinada pelo método desenvolvido por Bradford, 1976, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com agentes desnaturantes, “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (SDS-PAGE) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Para o gel de separação foram utilizadas a mistura dos seguintes reagentes: 1,5 mL de Tris-HCl 2M/SDS 0,4% (p/v) pH 8,8; 2,8 mL de acrilamida:bis (30:0,8), 13,5 µL de Temed 100% (v/v) e 60 µL de persulfato de amônio 10% (p/v). Enquanto que, para o gel de empilhamento foram utilizados: 625 µL Tris-HCl 2M/SDS 0,4% (p/v) pH 6,8, 500 µL de acrilamida:bis (30:0,8), 7 µL de Temed 100% (v/v) e 30 µL de persulfato de amônio 10% (p/v).

A solução de Tris-base 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% (p/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo. As amostras contendo 10 µg de proteínas foram dissolvidas em 20 µL do tampão da amostra, contendo: tris-HCl 0,06M pH 6,8, azul de bromofenol 0,001% e glicerol 10% (v/v), na presença ou não de 10 µL de agente redutor 2-β-mercaptoetanol 10% (p/v). A eletroforese foi conduzida a 25 mA de corrente, por aproximadamente 50 min, até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel.

Terminada a migração, o gel foi submetido em coloração por Coomassie G-250 (125 mg de Coomassie G-250 em 10 mL de ácido acético glacial P.A. e 90 mL de H₂O

destilada) e após 20-30 min o gel foi descorado durante 1 h com solução contendo 5% (v/v) metanol absoluto e 7% (v/v) de ácido acético glacial. O peso molecular foi estimado pelos padrões de pesos moleculares 6L AmershamTM (GE Healthcare) ou 8 L Color BurstTM Electrophoresis Marker (Sigma Chem. Co.). Para documentação dos géis foi utilizado câmara fotográfica digital Canon Power Shot G11, 10 Mega Pixels.

2.7.2. Ensaios de Western blot

Após a realização da eletroforese como descrito no item anterior o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 15-20 min com o tampão de transferência (100 mL de metanol P.A., 7,2 g de glicina e 1,52 g de tris-base, volume final de 500 mL) com lenta agitação. Concomitantemente, uma membrana de PVDF de mesma dimensão do gel foi lavada por 15 s com metanol absoluto P.A. e depois incubada com o tampão de transferência juntamente com 8 papéis filtro também com iguais dimensões do gel nas mesmas condições descritas anteriormente.

O “sandwich” foi montado com o gel e a membrana envoltos por 4 papéis filtro em cima e 4 embaixo. A transferência foi processada durante 45 min, 24 V e 300 mA utilizando a célula de transferência (Blot Semi-Dry Transfer cell, Bio-Rad). Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada por 1 h na solução de bloqueio formada pela mistura 0,5 g de caseína em 50 mL de T-TBS (Tween Towbin Transfer Buffer: 0,125 mL de Tween 20 em 250 mL de TBS). O tampão TBS foi produzido pela mistura de 25 mL de Tris-HCl 2 M pH 8,0 e 4,5 g de NaCl 0,15 M com H₂O para um volume final de 500 mL.

Em seguida, a membrana foi lavada 3 X em T-TBS durante 10 min cada e, posteriormente incubada por 1 h à temperatura ambiente e leve agitação em 10 mL de solução de anticorpos primários produzidos contra uma fração de lectina ou fração da peçonha total a uma concentração de 10 µg/mL (1:1.000) diluídos em T-TBS. Após 3 X de lavagem em T-TBS durante 10 min cada, a membrana foi incubada por 1 h com 10 mL de anticorpo secundário anti-IgG de coelhos conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:10.000 em TTBS). Lavou-se novamente a membrana por 3 X durante 10 min cada em TTBS.

Para a revelação, a membrana foi incubada com 10 mL do tampão da fosfatase alcalina (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 0,01 M) acrescido dos substratos NBT e BCIP, nas concentrações finais de 0,23 mM e 1,28 mM, respectivamente. O aparecimento das bandas coradas ocorreu entre 5-15 min e a reação foi interrompida com a lavagem da membrana em H₂O destilada. A membrana foi seca em papel filtro e depois foi obtida a foto digital utilizando a câmera fotográfica digital Canon Power Shot G11, 10 Mega Pixels.

2.7.3. Screening da biblioteca com frações de anticorpos de *S. plumieri*

O anti-soro contra uma fração de lectina ou contra uma fração total da peçonha total de *S. plumieri* foram produzidos em coelhos. O processo de screening da biblioteca foi como descrito por Ausubel, 1995, com modificações. Após a obtenção de réplicas da biblioteca induzidas com IPTG em membranas de nitrocelulose ou de nylon como descrito no item 2.7.: “Transferência da biblioteca de cDNAs para filtros de membranas”, as colônias de bactérias foram lisadas com tampão de lise bacteriana adotado por Tuan e Fitzpatrick, 1986, constituído por Tris-HCl 50 mM pH 7,5/MgCl₂ 5 mM/NaCl 150 mM contendo 3% (p/v) de BSA, 1 µg/mL DNase e 40 µg/mL de lisozima. O procedimento de lise ocorreu durante 6 h sob leve agitação e à temperatura ambiente.

Após a incubação, o tampão de lise foi removido e para bloquear sítios de ligação não-específicos, as membranas foram incubadas durante 12 h sob leve agitação e à temperatura ambiente em tampão TBS contendo 5% (p/v) BSA e NaN₃ 3 mM. No dia seguinte, os filtros de membranas foram lavados em tampão T-TBS por 30 min a 37°C e, em seguida foram incubados durante 1 h a 37°C com solução contendo o anticorpo primário produzido contra uma fração de lectina ou com a fração total em uma concentração de 10 µg/mL (1:1.000) diluídos em T-TBS. Após 3 X de lavagens (5 min cada) com o tampão T-TBS, o anticorpo secundário anti-IgG de coelhos (1:10.000) conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado e as membranas foram incubadas por 1 h a 37°C e, em seguida novamente lavadas 3 X (5 min cada) com tampão T-TBS.

Para a revelação, as membranas foram incubadas 2 X (2 min cada) com tampão fosfatase alcalina e, por fim, os substratos BCIP e NBT foram adicionados nas

concentrações finais de 0,23 mM e 1,28 mM, respectivamente. A reação procedeu por 15-50 min, dependendo da intensidade desejada. Colônias marcadas nos filtros de membranas foram isoladas da placa-mãe, após o alinhamento da membrana com a placa e o DNA plasmidial foi isolado como descrito no item 2.4.10.: “Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes (Mini-preparações)” e, por fim preparado para o sequenciamento do DNA.

2.8. Screening das subunidades α e β de *S. plumieri* por RT-PCR

Na tentativa de identificar as subunidades α e β de *S. plumieri* e descrever a estrutura primária do mRNA que codifica essa toxina, foram produzidos cDNAs de primeira fita utilizando o kit First-strand cDNA Synthesis (GE Healthcare Life Sciences), PCRs convencionais com Platinum® *Taq* DNA Polimerase, Brasil (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) e clonagem de fragmentos putativos para toxinas em pCR®8/GW/TOPO® TA (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.).

2.8.1. Desenho dos primers para as subunidades α e β de *S. plumieri*

Na ausência de informações relativas à sequências primárias de mRNAs que codificam toxinas de *S. plumieri*, o desenho dos primers foi feito baseando em sequências potencialmente conservadas de genes já descritos e depositados em banco de dados de toxinas encontradas em outros peixes-escorpião pertencentes a Ordem Scorpaeniformes.

Os genes escolhidos para PCR e clonagem são referentes à proteína dimérica letal, descrita como a principal toxina responsável pelas manifestações sistêmicas e clínicas por envenenamentos por peixes-escorpião (GHADESSY et al., 1996; GARNIER et al., 1997a; UEDA et al., 2006). Na tentativa de clonar as subunidades designadas α e β desta toxina majoritária no aparato peçonhento, várias combinações de primers forward e reverse foram utilizados nas reações de PCRs com o intuito de produzir fragmentos de cDNA que codificam genes para toxinas. As designações e sequências de nucleotídeos do primers forward e reverse usados em todos os experimentos de PCR e clonagem estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4: Designação e sequência nucleotídica dos primers utilizados para reações de RT-PCR e clonagem

Subunidade	Designação do primer	Sequência nucleotídica	Posição nucleotídica ^a
α			
Foward			
	Pteα-f	5' -ATGTCCTCAGAAATCTTGATA-3'	60-81
	α3-f	5' -GTTGSAGDCATGTCYTCA-3'	51-68
	α _T -f	5' -ATGTCTTCAGATTTGGTAATGCCT-3'	60-83
	Cat-f	5' -CGCAGAGAGAAACTGATCCCA-3'	126-146
	Deg1-f	5' -GATGGATATTGAAGCWTCTC-3'	260-279
	Deg2-f	5' -GGGGCMAATGCTTTCTTTGT-3'	498-517
	α-f	5' -CAAGGTAGAGGATACCAACC-3'	530-549
	Letα-f	5' -GTTAGTAAAGTGAGAAGGATTAC-3'	855-878
Reverse			
	Cataf-r	5' -TGGGATCAGTTTCTCTCTGCG-3'	126-146
	Cata-r	5' -ATTGGCTCTCCTCTTCAGTTT-3'	900-921
	α-r	5' -GGATAGTTCTGCCGTTTTCC-3'	1719-1738
	Deg-r	5' -CCACTCYAMCTCCCAGTAAT-3'	1804-1823
	Letα-r	5' -ATGGTGCACCTCATCAGAGGA-3'	2058-2078
	α _T -r	5' -ATAAACAGGCTCAGTAAATTTGGT-3'	2094-2117
	Pteα-r	5' -TTAAAGTAATTCAATCTCACC-3'	2150-2171
	Synα-r	5' -TYAAAGTAATCTGASAGTTCC-3'	2151-2171
	α3-r	5' -CACATGTTAAAGTAATTCAAT-3'	2199-2219
β			
Foward			
	β _T -f	5' -GTTGGAGTCATGCCTTCAGAC-3'	52-71
	β2-f	5' -ATGCCTTCAGACATCTTG-3'	61-78
	Cat-f	5' -CGCAGAGAGAAACTGATCCCA-3'	136-150
	Deg1-f	5' -GATGGATATTGAAGCWTCTC-3'	264-283
	Catβ-f	5' -AAGAAATTCAAGAATCAGAGT-3'	349-369
	Deg2-f	5' -GGGGCMAATGCTTTCTTTGT-3'	502-521
	CDβ-f	5' -GTCCTCAAGTCCTGCATG-3'	1165-1182
	CDβ _r -f	5' -TGGTATGACTGTGAGCTC-3'	1621-1638
	Degr-f	5' -ATTACTGGGAGGTGGAGTGG-3'	1790-1809
Reverse			
	β-r	5' -GGTTGAATCCACTTTGTTACTG-3'	528-549
	Catβ-r	5' -TCTGAGTTTCTTTGGTCTGCT-3'	1348-1368
	CDβ-r	5' -GAGCTCACAGTCATACCA-3'	1621-1638
	Degr	5' -CCACTCYAMCTCCCAGTAAT-3'	1790-1809
	Pteβ-r	5' -TAATTTAATCTGACCGTT-3'	2139-2157
	Synβ-r	5' -TAGTTTAATTTGACCATT-3'	2139-2157
	β _T -r	5' -ATTTTACAATAGTTTAATTTGACCATT-3'	2140-2166
	β3-r	5' -TGCACAAACATTTTACAATAR-3'	2156-2175
	CD(stop)-r	5' -GAGCTCACAGTCATACCATTAATTA-3'	1621-1638
Outros^b			
	TLYβ-f	5' -CCNTCNGAYATHYTNGTNGTNGCNGCNYTN-3'	ND
	Vera-f	5' -GCACAACTTCATCAGGTGGA-3'	ND
	sp-lec-f	5' -GAYGCNGARCCNCCNTCNCCN-3'	ND
	sp-lec-r	5' -NACRCADATNGANGGRAANA-3'	ND
	HSBACT-f	5' -TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'	ND
	HSBACT-r	5' -CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'	ND
	S26-f	5' -CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT-3'	ND

S26-r	5' -CGATTCCTGACAACCTTGCTATG-3'	ND
S26GG-f	5' -TTCGTCATCAGGAACATCGTGGAGG-3'	ND
S26GG-r	5' -TTGGGCAGGACATAGGAGTCGAAGA-3'	ND
S26HS-f	5' -TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG-3'	ND
S26HS-r	5' -CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA-3'	ND
Oligo Poli-T	5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	ND
GW1	5' -GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3'	ND
GW2	5' -GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA-3'	ND
M13(-21)	5' -TGTAACACGACGGCCAGT-3'	ND
M13-r	5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'	ND

^aRefere-se à Stonustoxina (fator letal) de *Synanceia horrida*.

^bPrimers: Trachynilisina de *Synanceia trachynis* (Tracβ-f), Verrucotoxina de *Synanceia verrucosa* (Verα-f), lectina de *S. plumieri* (sp-lec), normalizadores de bibliotecas de cDNAs e reações de PCR (S26, S26GG, S26HS e HSBACT), Gateway (GW) para clones extraídos com clonagem em pCR®8/GW/TOPO® TA, M13 universal para clones extraídos da biblioteca de cDNAs. ND = não detectado.

2.8.2. Screening da biblioteca de cDNAs baseado no método de PCR

Para identificar sequências de DNA que codificam para toxinas presentes na biblioteca, foi realizado PCR da biblioteca com primers específicos para toxinas e também utilizados nas amplificações da primeira fita de cDNA. As amplificações de fragmentos encontrados foram realizadas usando *Taq* Platinum® DNA polimerase (Invitrogen) e as condições das PCRs foram otimizadas variando a temperatura de anelamento dos primers e a concentração de MgCl₂, como descrito mais adiante.

O DNA utilizado nas PCRs para screening da biblioteca foi obtido direto da biblioteca (~ 10⁶ pfus), já que durante a reação, o DNA é desnaturado e os fagemídeos são liberados dos fagos servindo de molde ou, paralelamente, foi utilizado DNA fagemidial (~ 100-150 ng), obtido após o protocolo de excisão em massa da biblioteca.

Para a obtenção do DNA fagemidial, após o processo de excisão, a amostra foi desproteínezada com fenol: clorofórmio 1:1 (v/v), centrifugadas a 14.000 rpm por 2 min e no sobrenadante coletado foi adicionado igual volume de clorofórmio 100% (v/v). Após o vórtex, a amostra foi centrifugada novamente a 14.000 rpm por 2 min, o sobrenadante foi coletado e após a precipitação por 12 h a -20°C com etanol 100% (v/v), a amostra foi centrifugada durante 30 min a 4°C e o pellet foi lavado por 3 X com etanol 75% (v/v). Em seguida, o precipitado foi seco por centrifugação a vácuo, ressuspenso em H₂O DEPC e aproximadamente 100–150 ng de DNA foram utilizados como moldes nas reações de PCR. Os produtos de PCR foram analisados em gel de

agarose 1% e os resultados foram documentados utilizando câmera fotográfica digital Canon Power Shot G11, 10 Mega Pixels.

2.8.3. Expressão em sistema *E. coli* com tecnologia Gateway

Para expressão em sistema bacteriano, inicialmente em um fragmento que codifica uma região da toxina referente à subunidade β obtido por screening da biblioteca, foi novamente amplificado com um primer reverse contendo pelo menos um códon de parada e, subsequentemente foi clonado com o kit pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning with One Shot[®] TOP10 *E. coli* (Invitrogen[™], Life Technologies, Inc.), para produzir um clone de entrada, como descrito posteriormente no item 2.9.4. “Clonagem em pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA”. Após o isolamento de DNAs plasmidiais de clones recombinantes, foi realizada a reação de recombinação, misturando o clone de entrada com o vetor de destino pDEST[™]17 e para isso foi utilizado a mistura enzimática Gateway[®] LR Clonase II Enzyme Mix. Em seguida, a reação de recombinação foi transferida para as células eletrocompetentes DH5 α e os clones positivos foram selecionados para a produção de clones de expressão. O DNA plasmidial dos clones putativos purificados foram transformados em células *E. coli* de expressão BL21-AI[™]. Após crescimento das colônias em meio sólido, pelo menos dois transformantes foram selecionados para a expressão da proteína recombinante.

Para os experimentos de expressão, as colônias positivas foram cultivadas em meio líquido durante 12 h e, em seguida uma alíquota da cultura foi cultivada na diluição de 1:100 a 37°C, em velocidade de 200 rpm até que atingisse a D.O.₆₀₀ de 0,4 a 0,5, quando o indutor L(+)-arabinose foi adicionado para uma concentração final de 0,2% (p/v) para estimular a expressão. Alíquotas de 1 mL foram coletadas de hora em hora, até que se completou 4 horas de expressão e processadas para que houvesse lise das bactérias e liberação do conteúdo citoplasmático.

Para isso a cultura de bactérias era centrifugada a 4.000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em tampão de lise fosfato salina (PBS) 1 X gelado contendo 0,25% (p/v) de lisozima e essa mistura foi submetida a três choques térmicos sucessivos em banho-maria 37°C/nitrogênio líquido -70°C. Depois, a solução de bactéria ressuscitada foi sonicada na amplitude 30, com ciclos de 30

segundos sonicação/30 segundos intervalo, por três vezes, evitando a formação de bolhas. Durante toda a lise as amostras foram mantidas em gelo quando não manipuladas. Após duas etapas de lise, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação correspondia à parte solúvel da expressão, enquanto que o pellet à parte insolúvel. A parte solúvel, portanto, foi separada para análise em gel de poliacrilamida, como descrito no item 2.7.1.: “Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)”.

2.9. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada com 5 µg de RNA total ou 500 ng de mRNA e utilizando o kit First-strand cDNA Synthesis (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções dos fabricantes. Nesse processo ocorre a síntese de DNA complementar pela reação de RT-PCR.

Inicialmente o RNA foi ressuspendido em 8 µL de H₂O DEPC e aquecido em banho-seco a 65°C por 10 min. Antes da próxima etapa, o RNA dissolvido era incubado durante 5 min no gelo. Em um tubo de microcentrífuga-0,5 mL livre de nucleases foram adicionados e misturados os seguintes reagentes: 11 µL do tampão bulk first-strand cDNA mix, 1 µL da solução de DTT, 1 µL do primer Not I-d(T)₁₈ 20 µM e, por fim, a solução de RNA desnaturado.

A reação foi, então, incubada por 1 h, em banho-maria a 37°C. Logo em seguida, para desnaturar duplex de RNA-cDNA e inativar a transcriptase reversa, a reação foi aquecida a 90°C durante 5 min. A reação completa de síntese da primeira fita de cDNAs foi armazenada a -20°C e utilizada nas amplificações por PCR.

2.9.1. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR convencional

A produção e amplificação de cDNAs foram realizadas utilizando Platinum® *Taq* DNA Polimerase, Brasil (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), dNTPs mix (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) e oligo primers específicos (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) sintetizados para amplificar cDNAs de *S. plumieri*.

A mistura da reação de PCR era formada de: 2 µL tampão 10 X; 0,6-2,0 µL MgCl₂ 50 mM; 0,75 µL da solução de dNTP 10 mM; 0,5 µL primer forward 10 Mm; 0,5 µL primer reverse 10 µM; 0,5 µL cDNA; 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) para volume final de 20 µL em H₂O DEPC. Para otimização das reações de PCRs, as concentrações finais de MgCl₂ variaram de 1,5-5,0 mM e as temperaturas de anelamento foram entre 45-65°C, dependendo da combinação de primers. Os ingredientes foram misturados gentilmente com o auxílio de uma pipeta, adicionados em cada reação uma gota de óleo mineral e os tubos foram colocados no ciclo térmico da PCR.

O programa geral utilizado para amplificação do DNA foi realizado respeitando as condições de desnaturação, anelamento e tempos de polimerização: 94°C por 5 min; 35 ciclos (94°C por 30 s, 45-65°C por 30 s e 72°C por 1-2 min), uma extensão final de 5 min a 72°C e, por fim as reações foram mantidas a 4°C até o momento do uso. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% (v/v).

2.9.2. Análise e quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR e o perfil de DNAs plasmidiais foram analisados por eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1% (p/v) de acordo com a técnica descrita por Sambrook e Russell (2001). Géis foram preparados na presença de solução TAE 1 X (Tris-acetato 0,04 M/EDTA 0,001 M) e as amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA 6 X (1/6 do volume), contendo 0,05% (p/v) de azul de bromofenol, 0,05% (p/v) de xileno cyanol FF, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 60 mM e glicerol 60% (v/v).

As eletroforeses foram realizadas horizontalmente sob voltagem constante de 85 V durante 1 h. Os géis foram visualizados com luz ultravioleta (UV), após serem corados com 10 µL de uma solução de brometo de etídio (10 mg/µL) por 15 min. Os perfis de DNA obtidos eram comparados com os padrões de massa molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) e/ou GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

A quantificação dos produtos de PCR foram realizadas em espectrofotômetro[®]NanoDropND-1000 com leituras em absorbâncias de 260 e 280 nm ou por

comparação do perfil de DNA obtido com o padrão de massa molecular DNA λ Hind III (InvitrogenTM, Life Technologies, Inc.). Para documentação foi utilizado câmera fotográfica digital Canon Power Shot G11, 10 Mega Pixels.

2.9.3. Purificação dos produtos de PCR e isolamento de bandas em gel de agarose

A purificação dos produtos de PCR e isolamento de bandas de DNA em gel de agarose para reamplificação foram realizadas utilizando os kits IllustraTM GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare), respectivamente.

Nesse protocolo, para cada 20 μ L de produtos de PCR foram adicionados 100 μ L de tampão de captura tipo 3 fornecido pelo kit. Após a homogeneização, a mistura foi transferida para uma coluna illustra GFX MicroSpin e centrifugada a 14.000 rpm por 30 s à temperatura ambiente. Em seguida, a coluna GFX MicroSpin foi lavada com a adição do tampão de lavagem tipo 1 e novamente centrifugada a 14.000 rpm durante 30 s. Para eluir o DNA, foi adicionado na coluna o mesmo volume do produto PCR inicial (20 μ L) do tampão de eluição tipo 4. A coluna GFX foi transferida para um tubo de microcentrífuga-1,5 mL, incubada por 1 min à temperatura ambiente e, posteriormente centrifugada a 14.000 rpm por 1 min. O DNA eluído foi armazenado a -20°C até ser preparado para clonagem ou reação do sequenciamento.

Para purificar bandas de interesse em gel de agarose 1%, inicialmente as bandas foram visualizadas por iluminação ultravioleta (254 nm), fatiadas com o auxílio de um estilete e transferidas para tubos de microcentrífuga-1,5 mL. Para cada fatia de agarose contendo o DNA de interesse foram adicionados 10 μ L de tampão de captura tipo 3 para cada 10 mg da fatia do gel pesada e para dissolver a agarose as amostras foram incubadas por 15-30 min em banho-seco a 60°C. A purificação do DNA foi realizada utilizando o mesmo procedimento como descrito anteriormente. Após o isolamento, as bandas eram concentradas no speed vac e utilizadas como moldes nas reações de reamplificação por PCR convencional.

2.9.4. Clonagem em pCR®8/GW/TOPO® TA

Produtos de PCR amplificados com *Taq* polimerase foram clonados utilizando o kit pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning with One Shot® TOP10 *E. coli* (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.), de acordo com as instruções do fornecedor. A clonagem de fragmentos de DNA de interesse foi realizada para refinar os sequenciamentos, já que é conhecido que clones com vetores pCR® são facilmente sequenciados e caracterizados, além disso, com esse método há a vantagem de genes de interesse poderem ser subclonados para o sistema de expressão Gateway.

O vetor pCR®8/GW/TOPO® representado na figura 7, foi utilizado para clonagem de produtos de PCR amplificados utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase, que adiciona uma adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado. Por sua vez, o vetor é complexado com a enzima topoisomerase I e no qual há em suas pontas uma molécula de timina, permitindo que o inserto ligue eficientemente com o vetor, por mecanismos de recombinação. Essa reação de clonagem ocorre durante 5 min.

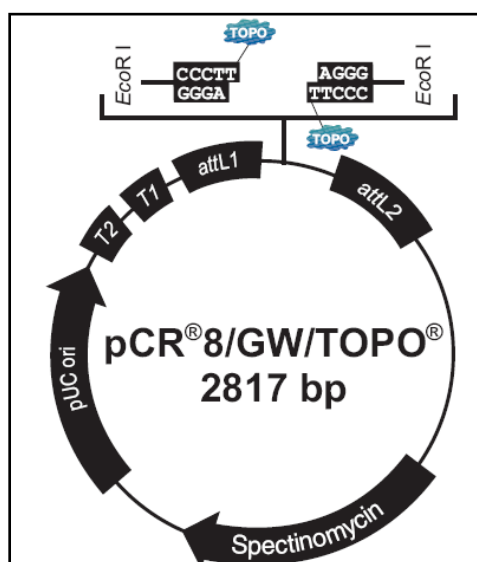


Figura 7: Mapa circular do vetor pCR®8/GW/TOPO®. A sequência completa e a lista dos sítios de restrição estão disponíveis em: www.lifetechnologies.com/support.

Para a realização da reação de clonagem TOPO®, foram adicionados em um tubo de microcentrífuga-0,5 mL estéril, os seguintes reagentes: 4 µL (~ 200 ng) do

produto de PCR previamente amplificado e purificado, 1 μL de solução salina (NaCl 1,2 M/MgCl₂ 0,06 M) e 1 μL de vetor pCR®8/GW/TOPO® linearizado (5-10 ng/ μL).

A reação foi misturada gentilmente e incubada por 5 min à temperatura ambiente. Após a incubação, a reação foi colocada no gelo e, em seguida, foi realizado o protocolo de transformação de células quimicamente competentes One Shot® TOP10 *E. coli*. Para isso, 2 μL da reação de clonagem TOPO® foram adicionados e misturados gentilmente em um tubo contendo as células competentes. A reação foi incubada no gelo por 5-30 min, e em seguida, as células receberam o choque térmico por 30 s a 42°C sem shaking. Imediatamente o tubo foi transferido para o gelo e foram adicionados à temperatura ambiente 250 μL de meio S.O.C. (tryptona 2% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM/KCl 2,5 mM/MgCl₂ 10 mM/MgSO₄ 10 mM/glicose 20 mM).

Posteriormente, o tubo foi incubado horizontalmente com shaking a 37°C por 1 h. Após a incubação, 50-70 μL da transformação foi plaqueada em placas de LB-ágar-espectinomicina (10 mg/mL) e incubadas na estufa a 37°C por 12 h. No dia seguinte, colônias foram selecionadas para isolamento do DNA plasmidial e verificação da presença de inserto. Os insertos clonados foram sequenciados usando primers GW específicos fornecidos pelo kit. Para controle do experimento e testar a viabilidade das células, foi realizado o mesmo procedimento utilizando na transformação 1 μL (10 pg) do plasmídeo pUC19.

2.10. Preparações de sondas de DNA marcadas com dCTP [α -³²P]

A PCR convencional foi utilizada para produzir sondas de DNA dupla fita com atividade altamente específica. O protocolo de preparação das condições da reação foi realizado de acordo com Sambrook e Russell, 2001. Para a amplificação de fragmentos de DNA alvo, inicialmente em um tubo de microcentrífuga-0,5 mL livre de DNases, foram adicionados na ordem descrita os seguintes reagentes: 2,5 μL de tampão PCR 10 X minus Mg; 1,5 μL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 μL solução de dNTP 10 mM minus dCTP; 0,5 μL de dCTP 0,1 mM; 1,25 μL de primer forward 20 μM ; 1,25 μL de primer reverse 20 μM ; 0,2 μL DNA (~ 10 ng); 0,5 μL de *Taq* DNA polimerase (2,5 U); 1,25 μL dCTP [α -³²P]-6.000Ci/mmol (10 mCi/mL) e 15,6 μL H₂O DEPC. Os ingredientes foram misturados

gentilmente com o auxílio de uma pipeta e os tubos foram colocados no ciclo térmico da PCR.

As condições de desnaturação, anelamento e tempos de polimerização foram as seguintes: 94°C por 1 min; 35 ciclos (94°C por 30 s, 55-60°C por 30 s e 72°C por 2 min) e, por fim, uma extensão final de 5 min a 72°C. Após a PCR, os tubos foram preparados para purificação do DNA e remoção do excesso de oligonucleotídeos não-incorporados durante a reação, segundo a técnica descrita anteriormente no item 2.9.3.: “Purificação dos produtos de PCR e isolamento de bandas em gel de agarose”. Para confirmar a incorporação de dCTP [α -³²P] no produto de PCR, foi realizado um gel de agarose 1% (p/v) que, após a eletroforese foi transferido para um cassete onde foi exposto com um filme de raios-X a -80°C durante 30 min antes da revelação.

2.10.1. Preparações dos filtros de membrana para hibridização

Após a obtenção de réplicas da biblioteca em membranas de nitrocelulose ou de nylon, como descrito no item 2.7.: “Transferência da biblioteca de cDNAs para filtros de membranas”, as membranas não induzidas com IPTG foram incubadas (com as colônias para cima) durante 5 min em papéis de filtro 3MM separados e previamente encharcados, respectivamente com solução I: NaOH 0,5 M, solução II: Tris-HCl 1 M, pH 7,5 e solução III: Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5/NaCl 1,25 M. Após esse procedimento, as membranas foram secas na estufa a 37°C. Para imobilizar o DNA contido nas réplicas antes da hibridização, as membranas foram submetidas à iluminação ultravioleta (UV), por no mínimo 5 min.

2.10.2. Screening da biblioteca de cDNAs com sondas radioativas marcadas com dCTP [α -³²P]

Na tentativa de identificar um clone individual dentro de uma população de milhares de outros clones presentes na biblioteca, foi realizado o protocolo básico de hibridização em formamida de membranas com sondas radioativas, segundo descrito por Ausubel, 1995.

Nesse procedimento, após preparação das membranas como descrito no item anterior e em 2.7.: “Transferência da biblioteca de cDNAs para filtros de membranas”, as membranas obtidas foram empilhadas individualmente uma sobre a outra (5-10 membranas) com adição da solução de hibridização preparada com a mistura dos seguintes reagentes: 48 mL de formamida deionizada, 24 mL de SSC 20 X (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7,0), 1 mL de Tris-HCl 2 M pH 7,6, 1 mL de solução de Denhardtts 100 X (10 g de Ficoll 400, 10 g de PVP e 10 g BSA, volume final 500 mL), 5 mL de H₂O deionizada, 20 mL de dextran sulfato 50% (p/v) e 1 mL de SDS 10% (p/v).

As membranas empilhadas e com a solução de hibridização foram transferidas para um saco de plástico, em seguida foi adicionado mais solução para cobrir todos os filtros e o saco foi selado. As membranas foram pré-hibridizadas com shaking em baixa velocidade por 5 h a 42°C.

Enquanto os filtros de membranas são pré-hibridizados, a sonda radioativa foi preparada com a adição de 1 mL (2 mg) de DNA de esperma de salmão, e a mistura foi aquecida por 10 min em banho-maria a 100°C. A sonda desnaturada foi diretamente colocada no gelo e, depois foram adicionados 2 mL de solução de hibridização.

Após os filtros de membranas serem pré-hibridizados, a sonda foi transferida cuidadosamente para o saco plástico e misturada com a solução de hibridização. O saco plástico foi reselado e incubado para hibridização por 12 h na incubadora com shaking a 42°C. A velocidade do shaking foi controlada para evitar a formação de bolhas entre as membranas e a solução.

No dia seguinte, a sonda foi retirada do saco plástico, armazenada a 4°C, e as membranas foram removidas. O excesso da sonda foi extraída por lavagem das membranas com tampão de baixa estrigência (SDS 0,1% (p/v), SSC 2 X). Após cada lavagem, o contador Geiger foi utilizado sobre as membranas para medir a radioatividade das mesmas. Uma vez que a lavagem é completa, pouco ruído é observado nas membranas quando monitoradas pelo contador Geiger. Portanto, nas condições experimentais, cada membrana foi lavada 3-5 vezes com o tampão de baixa estrigência.

Após as lavagens, as membranas foram preparadas para as autoradiografias em filmes de raios-X. Inicialmente, as membranas foram molhadas em solução SSC 0,2 X, colocadas em sacos de plástico e organizadas em cassetes para serem expostas a -80°C

sob os filmes de raios-X. Para obter uma orientação entre as membranas e os filmes, elas foram marcadas com tinta radioativa. Os cassetes contendo as membranas e os filmes foram armazenados a -80°C entre 2-15 dias, dependendo da intensidade do radioativo.

A revelação dos filmes de raios-X foi realizada em sala escura, desprovida de iluminação. Foram utilizadas soluções reveladoras e fixadoras (Kodak), respectivamente, para o processamento dos filmes. Cada filme foi mergulhado por 15-20 s em cada solução, lavados com água e postos para secagem à temperatura ambiente. Spots marcados nos filmes de raios-X foram alinhados com as respectivas membranas para a identificação da região marcada. Os clones putativos foram por sua vez isolados da placa-mãe, após alinhamento da membrana com a placa. O DNA plasmidial foi isolado, a presença de inserto foi confirmada por digestão do clone com enzima de restrição *EcoR* I e os clones foram preparados para sequenciamento.

Paralelamente, também foram realizados experimentos com placas contendo aproximadamente 1 milhão de colônias. Nesse caso, foi realizado um primeiro screening como descrito anteriormente e em seguida, após a revelação do filme e detecção da região marcada na placa-mãe, ela foi coletada e colocada para crescer em meio líquido LB por 12 h a 37°C . No dia seguinte, uma alíquota das colônias crescidas foi espalhada em novas placas LB e após o crescimento das colônias, foi realizado um rescreening novamente como já descrito anteriormente.

2.11. Sequenciamento do DNA

Sequências DNAs clonadas foram obtidas através do sistema de sequenciador automático 3.100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.). Os clones foram preparados para a reação do sequenciamento utilizando primers específicos forward ou reverse, seguindo o protocolo para BigDyeTM Terminator v1.1, v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems Inc.), derivado de Sanger et al., 1977.

Para a reação do sequenciamento em um tubo de microcentrífuga-0,2 mL foram adicionados os seguintes reagentes: 0,5 μL de BigDye, 1,5 μL do tampão de sequenciamento 5 X, 200-300 ng de DNA, 2 μL de primer forward ou reverse (5 μM) para um volume final de 10 μL com H_2O DEPC. O programa da PCR foi o seguinte: 96°C

por 1 min, 44 ciclos (96°C por 15 s, 50-55°C por 15 s, 72°C por 4 min) e 4°C até o momento da precipitação do DNA.

Os primers utilizados nas reações de sequenciamento foram: M13 forward ou reverse para os clones de cDNAs advindos da biblioteca de bacteriófagos, GW1 forward ou GW2 reverse para os produtos de PCR clonados em TOPO TA e, no caso, dos DNAs de fragmentos de toxinas encontradas, eles também foram sequenciados com primers específicos que os derivaram.

Terminada a reação do sequenciamento, o DNA foi precipitado com etanol, seguindo o protocolo fornecido pelo fornecedor (Applied Biosystems Inc.). Em cada da reação, foi adicionado 1 µL de EDTA 125 mM e 26 µL de solução de precipitação, formada pela mistura de 1 µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol 100% (v/v). Os tubos foram homogeneizados e armazenados à temperatura ambiente por 15 min.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 3.500 X *g* por 30 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 35 µL de etanol 70% (v/v) e as amostras foram centrifugadas novamente a 3.500 X *g*, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos por centrifugação a vácuo.

Para a transferência do material nas placas de sequenciamento, foram adicionados nas amostras 15 µL de formamida e incubados a 94°C por 2 min. Em seguida, as amostras foram transferidas para a placa de sequenciamento e as reações foram aplicadas no sequenciador automático 3.100 Genetic Analyzer. Após o sequenciamento do DNA, os resultados foram processados para análises bioinformáticas.

2.12. Análises bioinformáticas

A análise da qualidade das sequências obtidas foram feitas utilizando o ChromasPro Versão 1.5 e com o uso do programa disponível da Applied Biosystems, o Sequence Scanner v1.0. Foram consideradas sequências de boa qualidade aquelas que apresentavam em pelo menos 80% da sequência um valor de QV (Valor de Qualidade) acima de 10-20, o que corresponde a uma probabilidade de erro da base não ocorrer ser no máximo 10% de chances. O valor de (QV) é dado pelo programa sequence

scanner v1.0 e esse valor é calculado através da equação: $(QV) = -10 \log_{10} (Pe)$, onde Pe é a probabilidade de erro.

As sequências de nucleotídeos correspondentes aos vetores de clonagem, adaptadores ou DNA de *E. coli* foram removidas utilizando o programa VecScreen, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen>.

Após a edição e formatação em programa Fasta, as sequências de DNA obtidas durante esse trabalho, foram analisadas utilizando as ferramentas BLASTn, BLASTx e tBLASTx (ALTSCHUL et al., 1990) do servidor do banco de dados NCBI, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Sequências que apresentaram alinhamentos no BLAST com scores maiores que 80 e E-value $\leq 10^{-10}$ foram consideradas significantes ou representativas (THANH et al., 2011).

O programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) foi utilizado para agrupar ESTs > 100 bp em contíguas sequências (sobreposição de ESTs que juntos representam uma sequência consenso). Em seguida, as sequências (contigs e singlets) foram pesquisados no banco de dados (nr/NCBI) utilizando o programa BLASTx (ALTSCHUL et al., 1990), (E-values $< 1.0 \times 10^{-10}$) disponível no programa BLAST2GO (CONESA et al., 2005). Análises das principais vias bioquímicas encontradas para as ESTs foram realizadas utilizando as vias KEGG (OGATA et al., 1999).

A tradução “*in silico*” das sequências de nucleotídeos que codificam substâncias tóxicas foram feitas utilizando ferramentas presentes no servidor Expasy, disponível em: <http://www.expasy.ch>, através do programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Análises adicionais também foram feitas pelo banco de dados PROSITE (HULO et al., 2006) para a identificação de domínios e/ou motivos protéicos.

O alinhamento de proteínas foi realizado com o Clustalw EBI 2.1 (THOMPSON et al., 1994), disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2> e quando necessário foi utilizado o programa Reverse-Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) para colocar as sequências na mesma ordem de leitura.

Com relação ao mRNAs que codificam as toxinas encontradas em *S. plumieri*, foram determinados o pI e a massa molecular das toxinas preditas utilizando o programa disponível no ScanSite (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html). A

predição de peptídeos sinais foram realizados utilizando o programa SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011). Além disso, foi feita a verificação de sítios de glicosilação nas sequências utilizando o programa NETNGLYC, disponível no servidor ExPASy: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>.

As predições de α -hélices foram realizadas utilizando o programa pelo programa PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (UCL Department of Computer Science). Para a toxina (subunidades α e β) descrita nesse trabalho, foram pesquisadas nas sequências traduzidas, a presença de α -hélices anfifílicas e sítios catiônicos, uma vez que a atividade citolítica de muitas proteínas e peptídeos é devido à presença de aminoácidos catiônicos flanqueados por uma superfície hidrofóbica (KINI; EVANS, 1989). As predições de α -hélices na estrutura secundária da toxina também foram realizadas através do diagrama de “Edmundson Wheel” (SCHIFFER; EDMUNDSON, 1967), no qual a anfipaticidade da α -hélice é determinada ajustando seus resíduos num diagrama de roda helicoidal. Nesse diagrama é visualizada a face superior da hélice, com as cadeias laterais dos resíduos projetadas em um plano perpendicular ao eixo longitudinal.

As sequências traduzidas das subunidades α e β foram também pesquisadas em um banco de dados para peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP>) e as predições de APs (Antimicrobial Peptides) foram realizadas pelo programa AMPA (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa>).

Árvores filogenéticas foram construídas para as sequências completas que codificam proteínas completas (descritas nesse trabalho) de *S. plumieri*. As árvores foram geradas pelo algoritmo do Clustal W (THOMPSON et al., 1994) combinado com o programa Tree View (PAGE, 1996).

3.0. Resultados

3.1. Preparações de RNA de *S. plumieri*

Espinhos dorsais, pélvicos e caudais de 5-6 espécimes jovens de *S. plumieri* foram removidos para a extração de RNA total utilizando o método de guanidina isotiocianato-fenol-clorofórmio. Antes do sacrifício os animais foram ofendidos várias vezes para estimular a produção de RNA mensageiro das glândulas de peçonha (PAINE et al., 1992). Os resultados (Tabela 5) mostram que para cada 1 g de tecido (peso após triturar e formar pó fino) foram recuperados em torno de 100 µg de RNA total quando realizada a quantificação em espectrofotômetro [®]NanoDropND-1000. As amostras exibiram valores de razão 260/280 em torno de 1,9.

Tabela 5: Parâmetros de preparações de RNA total e mRNA obtidas por extração ácida com guanidina e por purificação em coluna de afinidade oligo(dT) celulose.

Método	Razão (260/280) ^b	Recuperação (µg RNA/g tecido) ^{c,d}
GITC ^a	1,97 ± 0,09	90,6 ± 15,7
Oligo(dT) celulose	1,92 ± 0,2	3,9 ± 2,5

^aGITC: Método Isotiocianato de Guanidina-Fenol-Clorofórmio (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

^bAbsorção de preparações de RNA total e mRNA foram determinadas espectrofotometricamente a 260 e 280 nm.

^cRecuperação determinada em espectrofotômetro [®]NanoDropND-1000.

^dResultados representam a média de quatro diferentes preparações de RNA total e mRNA.

O perfil do RNA total foi obtido com a eletroforese em gel de agarose 1% na presença de tampão desnaturante MOPS: formaldeído e para verificar a integridade das moléculas de RNA, as amostras foram comparadas com preparações de RNA total isolados de fígado de *Rattus norvegicus* e tRNA de *Escherichia coli*.

A figura 8A, canaletas 3 e 4 mostram que o RNA total de *S. plumieri* possui um perfil típico de distribuição de RNAs equiparado com organismos superiores com a presença de bandas 28S e 18S rRNA entremeados com um arraste de RNA, como observado ao longo das canaletas. A incubação das amostras de RNA durante 2 h a 37°C não mostraram alterações na distribuição de RNAs (Figura 8B, canaleta 2)

confirmando a estabilidade das preparações, característica fundamental para a construção de uma biblioteca de cDNAs.

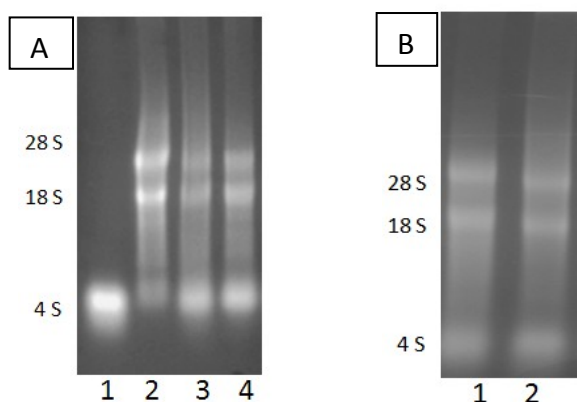


Figura 8: Gel agarose-formaldeído do perfil eletroforético do RNA total isolado do aparato peçonhento de *S. plumieri*. (A) 1: 2 µg de tRNA de *E. coli*; 2: 2 µg de rRNA de *Rattus norvegicus*; 3-4: 2 µg de RNA total de *S. plumieri*. (B) 1: 2 µg de RNA total de *S. plumieri*; 2: as mesmas amostras de RNA incubadas por 2 h a 37°C antes da eletroforese.

Prosseguindo, as amostras de RNA total foram purificadas para a obtenção de uma fração com moléculas poliadeniladas utilizando sistema de cromatografia em coluna com resina de afinidade oligo(dT) celulose. Nesse procedimento, após a passagem do RNA total na coluna foram recuperados aproximadamente 4 µg de poli(A)⁺ RNA para cada 1 g de tecido triturado (Tabela 5).

3.2. Construção da biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*

A construção da biblioteca de cDNAs foi realizada de acordo com o protocolo descrito na seção 2.4. “Construção e caracterização da biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*”.

Os cDNAs foram sintetizados utilizando 5 µg da fração de poli(A)⁺ RNA e, em seguida foram fracionados por tamanho em uma coluna de Sepharose® CL-2B. Para a obtenção de cDNAs (> 400 bp), o manual da Stratagene recomendou coletar as 12 primeiras frações (Figura 9) e a passagem do “loading dye” foi utilizada para monitorar

a cromatografia. Após a quantificação dos cDNAs com absorvância a 260 nm, observa-se na figura 9 que a cromatografia gerou três frações, sendo que a fração 1 atingiu o pico com aproximadamente 20 ng/μL de cDNAs (tubo 4), a fração 2 atingiu com 40 ng/μL de cDNAs (tubo 7) e a fração 3 atingiu o pico com 90 ng/μL de cDNAs (tubo 11).

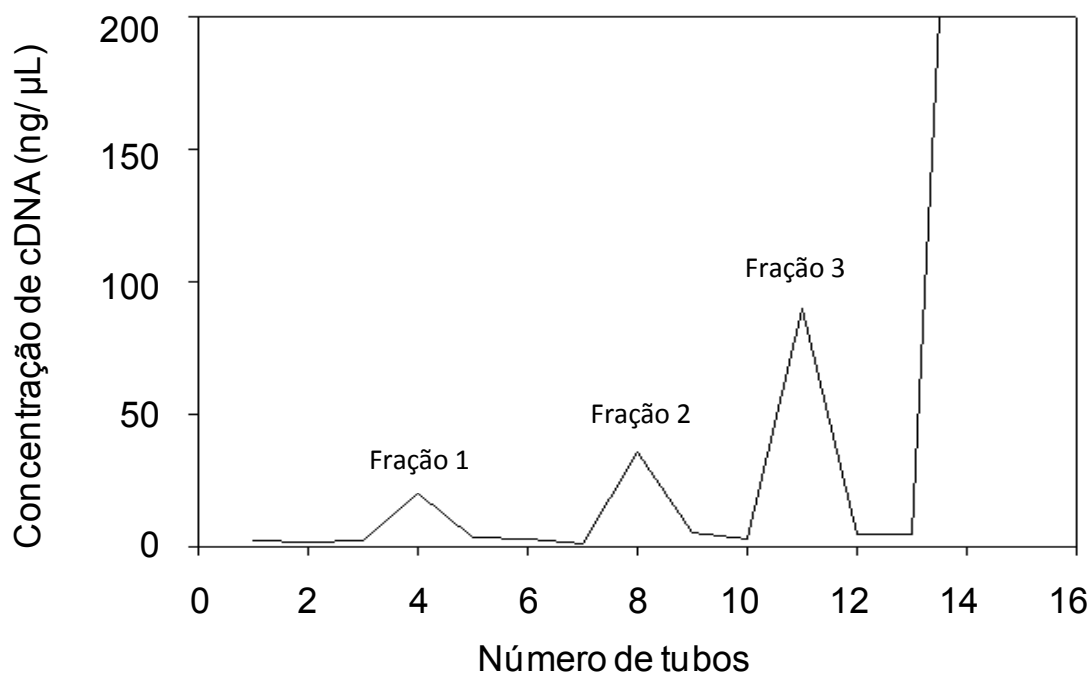


Figura 9: Cromatografia dos cDNAs de *S. plumieri* em Sepharose® CL-2B. A coluna foi previamente equilibrada com tampão STE 10 X (NaCl 1 M, Tris-HCl 200 mM pH 7,5, EDTA 100 mM) na diluição 1:10. As amostras foram eluídas na presença do mesmo tampão, num fluxo constante de 5 mL/h a temperatura ambiente. Frações contendo (3 gotas/tubo ~ 100 μL) foram coletadas. A presença de cDNAs foi determinada nas frações eluídas utilizando o espectrofotômetro® NanoDropND-1000 com absorvância a 260 nm.

As três frações contendo cDNAs foram juntadas, concentradas e 375 ng foram utilizados para a reação de ligação com o vetor Uni-ZAP XR seguindo as instruções do fornecedor. Subsequentemente o produto foi empacotado em fagos λ utilizando o extrato de empacotamento Gigapack III Gold (Stratagene). Para testar a eficiência do empacotamento, o DNA λ intacto foi utilizado como controle da reação, o qual gerou $1,8 \times 10^6$ pfus totais (Tabela 6).

A biblioteca primária de fagos foi titulada gerando-se $1,85 \times 10^5$ pfus totais. Para gerar uma biblioteca estável, ela foi amplificada aumentando seu título para $2,5 \times 10^9$ pfus/mL. Quando testada com IPTG e X-gal para a quantificação de colônias com inserto medida pela expressão da β -galactosidase (azul) foi $< 10\%$, enquanto que clones com insertos (brancos) mostraram ser $> 90\%$. Entretanto, a porcentagem de recombinantes decresceu para 65% quando uma fração da biblioteca amplificada foi excisada para a liberação dos fagemídeos (Tabela 6).

Tabela 6: Títulos obtidos dos fagos e da biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*.

Biblioteca	Título	Título total	% recombinantes ^a
Helper ExAssist ^b	$2,7 \times 10^{11}$ pfu/mL	$5,4 \times 10^{11}$ pfus	-----
DNA λ^c	$3,6 \times 10^6$ pfu/mL	$1,8 \times 10^6$ pfus	-----
Primária ^c	$3,7 \times 10^5$ pfu/mL	$1,85 \times 10^5$ pfus	90
Amplificada ^b	$2,5 \times 10^9$ pfu/mL	$5,0 \times 10^{10}$ pfus	90
Fagemidial ^d	$1,0 \times 10^8$ cfu/mL	$2,0 \times 10^9$ cfus	65

^aDeterminado em placas NZY ágar/top ágar ou LB ágar-ampicilina (0,1 mg/mL) contendo IPTG 2,5 mM e X-gal (50 mg/mL).

^b $\frac{\text{Número de placas (pfu)} \times \text{fator de diluição} \times 1000 (\mu\text{L/mL})}{\text{Volume plaqueado} (\mu\text{L})}$

^c $\frac{\text{Número de placas} \times \text{fator de diluição} \times \text{Volume total empacotado}}{\text{Número total de } \mu\text{g empacotados} \times \text{Volume plaqueado} (\mu\text{L})}$

^dTítulo da biblioteca em sistema plasmidial utilizando 1 μL de fagemídeos após o protocolo de excisão em massa “*in vivo*” (volume total = 20 mL).

Para o procedimento de excisão “*in vivo*” e recircularização do fagemídeo pBluescript, foi utilizado o sistema de fagos helper ExAssist cujo título inicial foi de $2,7 \times 10^{11}$ pfu/mL (Tabela 6), titulação que encontrou-se entre $7,5 \times 10^{10}$ e $1,0 \times 10^{12}$ pfu/mL, como sugerido pelos fornecedores.

Uma porção de aproximadamente $1,85 \times 10^7$ pfus da biblioteca amplificada (equivalente a 100 X o título da biblioteca primária) foram combinados com $1,85 \times 10^8$ células XL1-Blue MRF' correspondendo a multiplicidade de infecção (MOI) 1:10 fagos da biblioteca/células. Em seguida, durante a excisão foram adicionados fagos helper ExAssist ($1,85 \times 10^9$ pfus) com MOI 10:1 em relação às células XL1-Blue, para assegurar que todas as células XL1-Blue fossem co-infectadas com os fagos obtidos da biblioteca

e também com os fagos helper, de acordo com o protocolo descrito na seção Métodos 2.4.9. “Excisão *in vivo*” do fagemídeo pBluescript® do vetor Uni-ZAP XR”.

3.3. Screening randômico da biblioteca de cDNAs

Durante o screening randômico da biblioteca, colônias brancas foram selecionadas em placas de LB-ágar-ampicilina (100 µg/mL) contendo IPTG (2,5 mM) e X-gal (50 mg/mL) e recolhidas aleatoriamente para isolamento do DNA plasmidial e sequenciamento do DNA. Plasmídeos de 470 clones foram purificados, após seleção das colônias brancas e inoculação em meio líquido LB.

A figura 10 mostra o perfil de uma porção representativa do DNA plasmidial recuperado e quantificado por eletroforese em gel de agarose. Para confirmar a presença de insertos nos clones, eles foram digeridos com enzimas de restrição *EcoR* I para linearização do plasmídeo (Figura 11). Os clones que apresentaram insertos > 3 kb (tamanho correspondente ao vetor pBluescript vazio) foram selecionados e aqueles insertos maiores que 300 bp (aproximadamente 80%) foram tratados com RNases durante 1 h a 37°C e, em seguida desproteinizados com fenol:clorofórmio 1:1 (v/v), precipitados com etanol 100% (v/v) e, por fim, lavados 2 X com etanol 75% (v/v) antes de serem preparados para o sequenciamento do DNA.

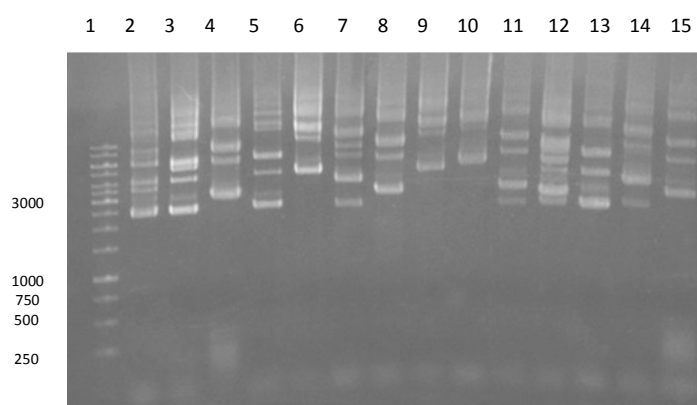


Figura 10: Eletroforese em agarose 1% corado com brometo de etídio do DNA plasmidial obtidos de uma amostragem randômica da biblioteca. (1): 1 kb DNA Ladder, (2-15): DNA plasmidial após tratamento das amostras com RNase (20 µg/mL) e fenolização.

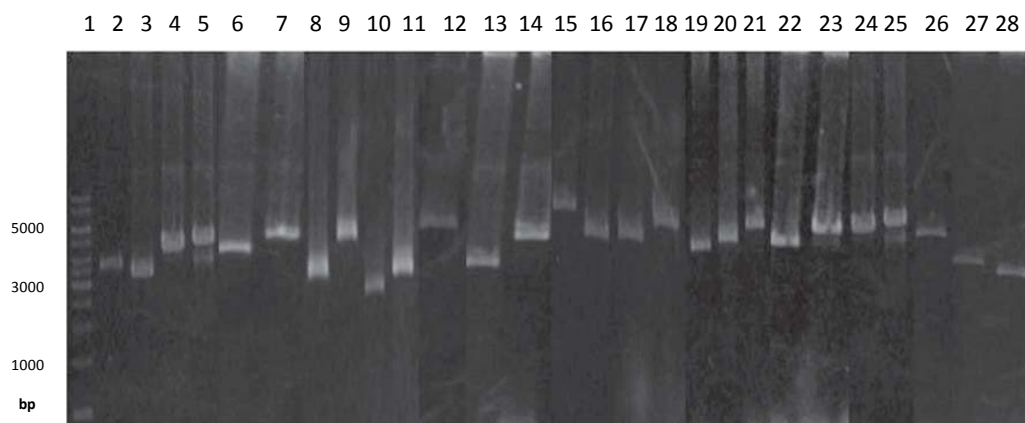


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de uma amostragem de clones da biblioteca após digestão com *EcoR* I. (1): 1 kb DNA Ladder, (2-28): $v = 10 \mu\text{L}$ ($\sim 200 \text{ ng}$ de cada DNA após a digestão).

O sequenciamento do DNA foi realizado para um total de 470 clones utilizando primers M13. Após remoção das sequências de baixa qualidade com o auxílio do programa da Applied Sequence Scanner v1.0, as sequências foram editadas para formato Fasta.

Após a remoção da contaminação por vetor, *E. coli*, DNA mitocondrial e das sequências de RNA ribossomal, 356 clones individuais foram selecionados e catalogados como ESTs (Expressed Sequence Tags) para análises adicionais. O gráfico de barras na figura 12 ilustra a distribuição do tamanho das ESTs. As sequências foram classificadas em grupos de acordo com os seguintes tamanhos: 0.2-0.5 kb (31,4%), 0.5-1.0 kb (39,4%) e 1.0-1.2 kb (29,2%). Como é observado nesta figura, a distribuição de ESTs no screening randômico não é unimodal, prevalecendo maiores frequências de ESTs > 400 bp, seguido por ESTs com tamanho > 1.000 bp.

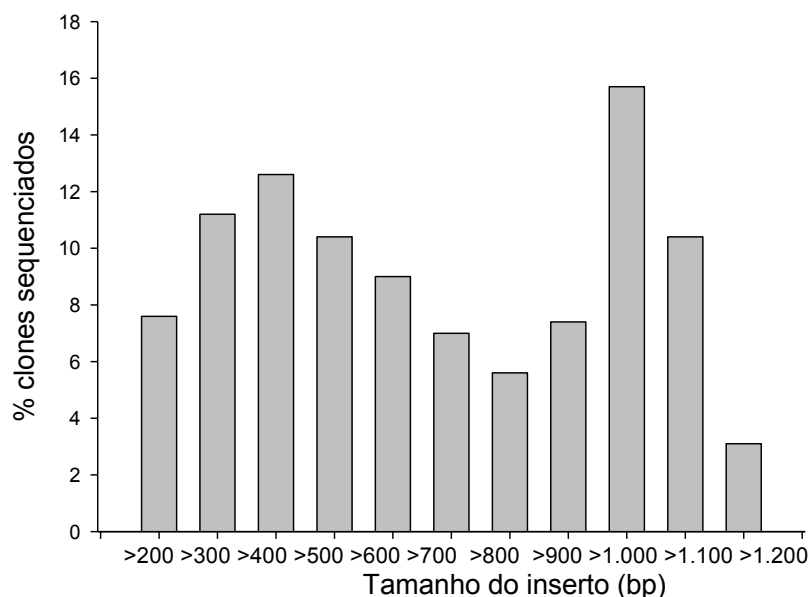


Figura 12: Distribuição do tamanho dos insertos sequenciados após screening randômico da biblioteca. O intervalo das ESTs variou entre 200-1.200 bp.

As sequências obtidas foram submetidas a análises de similaridade em banco de dados BLASTn com sequências previamente depositadas. Dessa maneira, as sequências foram classificadas em categorias utilizando a função atribuída para a sequência original e, caso uma EST compartilhava funções com mais de uma categoria, o critério de classificação aplicado segue a função putativa principal, ou seja, aquela com maior identidade.

A figura 13 mostra a categorização das ESTs após screening randômico. Os dados revelam uma grande proporção de sequências não identificadas pelo banco de dados BLASTn (N= 107, 30%), seguido por (N= 61, 17%) de proteínas hipotéticas (como designadas no banco de dados) e quantidades similares de ESTs correspondentes a enzimas metabólicas (N= 61, 17%), seguido por proteínas associadas a funções de sinalização (N= 49, 14%), e os grupos restantes formados por genes envolvidos na síntese de proteínas e processamento, proteínas regulatórias e proteínas estruturais (N= 78, 7-8%).

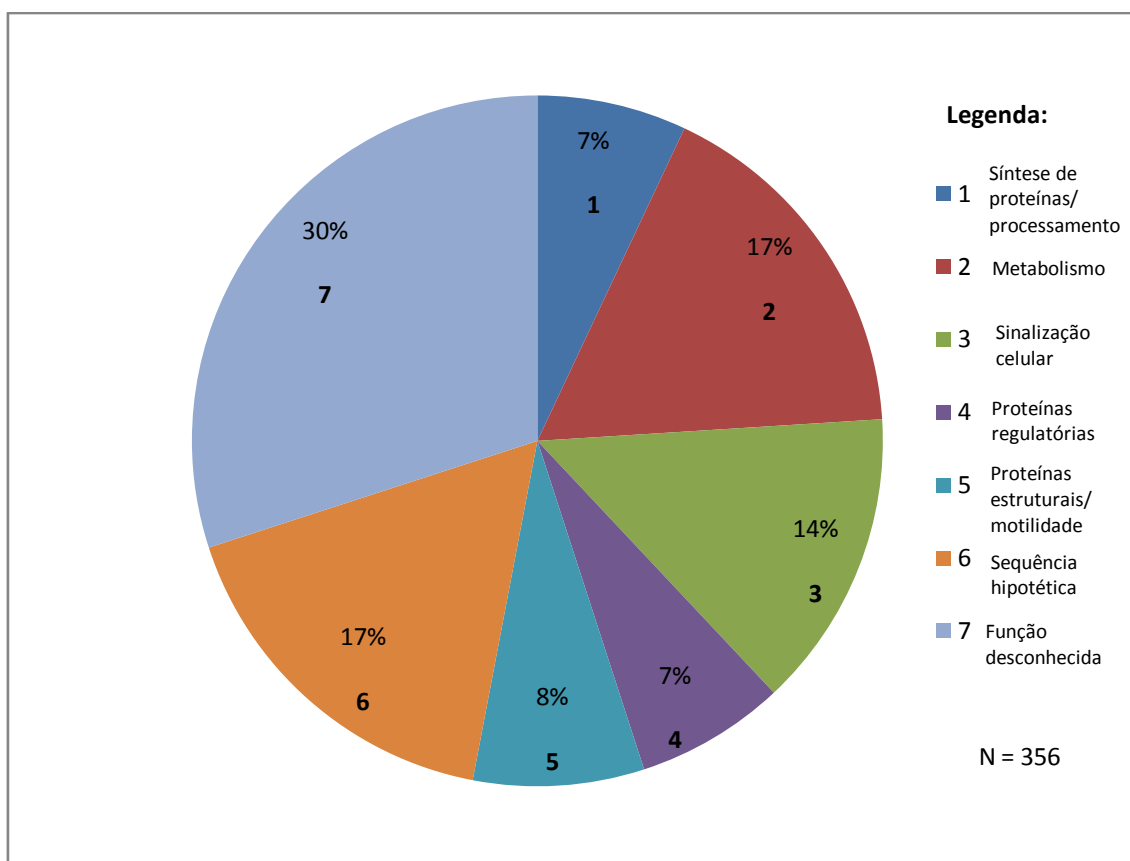


Figura 13: Classificação de ESTs obtidas da biblioteca de *S. plumieri* baseado em suas semelhanças com funções descritas em BLASTn. No diagrama de “pizza” está representada a proporção relativa de cada categoria, sendo: **(1)**: “Síntese de proteínas/ processamento” contêm ESTs que codificam proteínas ribossomais e de tradução; **(2)**: “Metabolismo” contêm ESTs de proteínas presentes em mitocôndrias, enzimas do citosol, de fosforilação e processos oxidativos; **(3)**: “Sinalização celular” compreende proteínas de ligação, tráfico intracelular ou sinalizadoras; **(4)**: “Proteínas regulatórias” contêm genes que codificam fatores de transcrição e regulação gênica; **(5)**: “Proteínas estruturais/motilidade” incluem proteínas do citoesqueleto e componentes da matriz extracelular; **(6)**: “Sequência hipotética” incluem ESTs preditas como proteínas hipotéticas; **(7)**: “Função desconhecida” todas aquelas ESTs cujas sequências não foram encontradas no banco de dados.

Durante o screening randômico, foram selecionadas 115 ESTs com alta similaridade e score ≥ 80 pesquisados no banco de dados BLASTn. A tabela 7 mostra a lista das similaridades obtidas com sequências anotadas no BLASTn, o número de acesso do GeneBank, o E-value e score, a identidade da sequência alvo e o número de

vezes que cada EST foi identificada. A tabela ordenada por categorias inclui 63 (55%) de cópias únicas e 52 (45%) correspondendo a duas ou mais cópias identificadas na biblioteca. ESTs categorizadas no grupo “Metabolismo” tiveram valores de E-value e score que variaram entre 0.0 (1282) e 2e-13 (86), enquanto que o grupo “Estrutural/Motilidade” variou entre 0.0 (1387) e 8e-20 (107) e o grupo “Sinalização celular” variou entre 0.0 (1325) e 2e-11 (80.6). Por fim, o grupo “Regulatórias” variou entre 0.0 (1308) e 2e-12 (84.2).

Tabela 7: Lista representativa de “hits” das ESTs em BLASTn dos clones sequenciados da biblioteca de *S. plumieri* ($\leq 10^{-10}$, score ≥ 80).

Grupo	HIT ID	E-value (score)	Identidade	Nº de ESTs
Metabolismo				
	FJ629181.1	0.0 (1282)	Kinase I	1
	BT083258.1	0.0 (1097)	p-21-activated protein kinase	1
	XM003446848.1	0.0 (905)	ADP/ATP translocase 2-like	2
	EU036495.1	1e-179 (640)	Cytochrome b	7
	FJ426129.1	2e-177 (632)	Chaperonin subunit 7	1
	DQ900715.1	7e-149 (536)	Cytochrome c oxidase subunit II	3
	XM003459458.1	6e-119 (437)	N-acetylgalactosaminyltransferase-like	2
	FJ826528.1	5e-70 (275)	Malate dehydrogenase	1
	XM003454129.1	2e-13 (86)	Protein tyrosine phosphatase type IVA	1
Estrutural/Motilidade				
	JF317678.1	0.0 (1387)	β -actin	4
	JN112540.1	0.0 (1225)	Keratin 8	1
	AB196514.1	0.0 (1151)	Collagen, type 1, alpha 2	5
	AF263276.1	0.0 (959)	Alpha tubulin	1
	XM003449910.1	0.0 (937)	T-complex protein 1 subunit alpha	1
	AB603658.1	0.0 (926)	Collagen, type 1, alpha 3	1
	AB196514.1	0.0 (911)	Collagen, type 1, alpha 1	3
	AB490880.1	0.0 (699)	Ferritin heavy chain	1
	BT082330.1	7e-136 (494)	Peripheral myelin	1
	DQ364242.1	3e-125 (459)	Keratin 1	2
	XM004070275.1	9e-100 (374)	Intermediate filament protein ON3	1
	BT083320.1	3e-83 (318)	MANBAL	1
	XM003452967.1	8e-43 (185)	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	1
	XM002665878.3	3e-23 (120)	Procollagen, type V, alpha 1	1
	AY787209.2	8e-20 (107)	Cartilage-specific S100-like protein	1
Sinalização celular				
	BT028386	0.0 (1325)	Guanine nucleotide binding protein	3
	AB326303.1	0.0 (1129)	Elongation factor 1-alpha	5
	XM003442398.1	0.0 (996)	Coronin-1A-like	1
	XM003449701.1	0.0 (990)	Arfaptin-1-like	1
	XM003449090.1	0.0 (900)	Angiopietin	1
	FJ455761.1	0.0 (776)	QM-like protein	1
	GU988616.1	7e-161 (577)	Annexin A11	1
	XM003451608.1	7e-161 (577)	MYC binding protein 2	1
	AB618145.1	1e-96 (449)	Fish-egg lectin	24
	FJ800037.1	9e-109 (403)	Apolipoprotein E	1
	AB201746.1	3e-106 (394)	Lily-type lectin	1
	XM003441063.1	4e-100 (374)	PDZ and LIM domain protein 1-like	1
	GU060308.1	1e-74 (289)	S100-like calcium binding protein	1
	HQ441029.1	2e-64 (255)	Poly A binding protein, cytoplasmatic 1b	1
	XM003445768.1	6e-62 (248)	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	1

XR134816.1	4e-52 (215)	Fibronectin-like	1
XM003449138.1	1e-27 (200)	von Willebrand factor A domain	4
X81969.1	8e-45 (190)	D1c dopamine receptor	1
XM003449453.1	1e-41 (179)	SUN domain protein	1
BT044760.1	6e-27 (131)	Ras-related protein Rab-10	1
FJ826549.1	5e-26 (129)	C-type lectin 7	2
FJ826556.1	4e-21 (111)	C-type lectin 14	1
AB084425.1	1e-20 (109)	Solute carrier family 26	1
XM003438149.1	2e-18 (104)	Calcyclin-binding protein	1
HQ441075.1	2e-11 (80.6)	Cofilin-2	1
Regulatórias			
HQ646108.1	0.0 (1308)	Heat shock cognate 70	2
XM003451520.1	0.0 (1201)	Thrombospondin-4-B-like	1
FJ644278.1	0.0 (1090)	Heat shock protein 90	2
AY647431.1	1e-142 (516)	IRF-1	1
BT046051.1	3e-31 (145)	Profilin-2	1
XM003455475.1	4e-30 (141)	Thymosin beta-12-like	2
XM003437992.1	2e-26 (129)	Integrin alpha-6-like	1
AJ556548.1	2e-16 (96.9)	TRAF4 protein	1
HQ447060.1	2e-12 (84.2)	Haplotype 2 AFGP/TLP	1

Do total de clones sequenciados, 119 (33%) apresentaram forte identidade (score > 401), enquanto que 57 (16%) tiveram matches com scores entre 201-400 e 88 (25%) com scores entre 80-200. ESTs que tiveram matches fracas, < 80 totalizaram 92 (26%).

3.4. Screening da biblioteca de cDNAs com anticorpos

A caracterização da biblioteca de cDNAs prosseguiu mediante o screening imunológico utilizando anticorpos produzidos em coelhos utilizando uma fração de lectina como imunógeno e outra com peçonha total de *S. plumieri*, os quais foram fornecidos de acordo com protocolos padrão da Fundação Ezequiel Dias R & D (FUNED - Belo Horizonte, Brasil). Para isso, uma fração da biblioteca foi excisada “*in vivo*” e, em seguida células SOLR foram infectadas com os fagemídeos liberados do processo de excisão. Após o crescimento das colônias em ágar contendo ampicilina, réplicas das placas contendo colônias foram geradas após transferência das colônias para membranas de nitrocelulose.

Antes de iniciar o screening imunológico, foi realizado um experimento de dot blot em membranas de PVDF para determinar a reatividade dos anticorpos e a concentração de peçonha total capaz de reagir com os anticorpos primários. O dot blot para ambas as frações foram semelhantes e indicaram uma forte reação de anticorpos com diluição 1:1.000 e concentrações de peçonha total que variaram de 0,01-10 µg

(dados não mostrados). Utilizando várias concentrações de peçonha total foi possível identificar as diluições apropriadas das duas frações de anticorpos para a visualização da reação após revelação das membranas com tampão fosfatase alcalina acrescidos com os substratos NBT e BCIP.

Em seguida, 10 μ g de peçonha total sob condições redutoras ou na ausência de redução foram separados por eletroforese SDS-PAGE (Figura 14A) seguido por Western blot (Figura 14B). Como é observado na figura 14A, o perfil eletroforético da peçonha total não foi alterado quando as amostras foram analisadas nas duas condições. Nas análises de Western blot, os anticorpos anti-lectinas reconheceram proteínas de baixa massa molecular, aproximadamente 14 kDa sugerindo o possível reconhecimento de lectinas presentes na peçonha total de *S. plumieri* (Figura 14B).

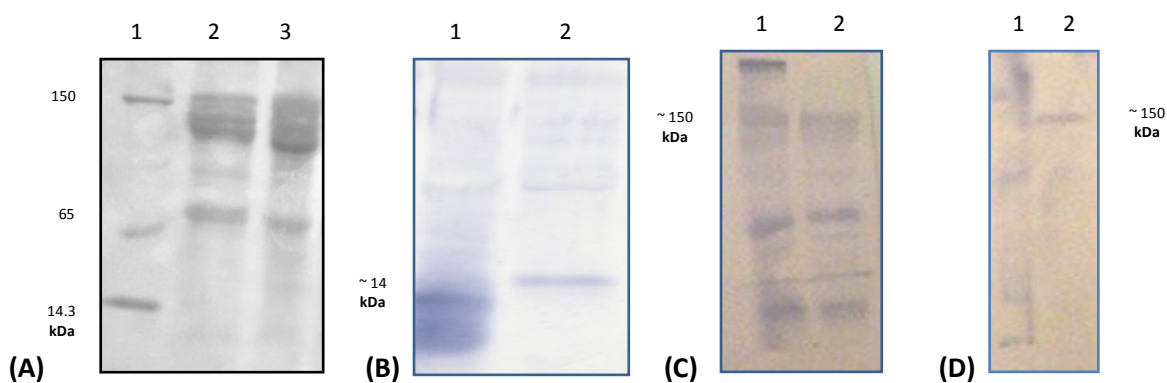


Figura 14: Eletroforese SDS-PAGE e Western blot da peçonha total de *S. plumieri*. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com agentes desnaturantes da fração da peçonha total de *S. plumieri* na presença ou ausência de β -mercaptoetanol. (1): Marcador de massa molecular; (2): 10 μ g da peçonha total em condições redutoras; (3): 10 μ g de peçonha total não reduzida. (B) Ensaio de Western blot da peçonha total com anticorpos anti-lectinas após incubação da membrana de PVDF por 1 h. (1): 10 μ g de peçonha total reduzida e (2): 10 μ g de peçonha total não-reduzida. (C) Ensaio de Western blot da peçonha total com a fração anti-peçonha total após incubação da membrana de PVDF por 12 h. (1): 10 μ g de peçonha total reduzida e (2): 10 μ g de peçonha total não-reduzida. (D) Ensaio de Western blot da peçonha total com a fração anti-peçonha total após incubação da membrana de PVDF por 1h. (1): 10 μ g de peçonha total reduzida e (2): 10 μ g de peçonha total não-reduzida.

Durante os ensaios de Western blot com anticorpos obtidos contra a peçonha total e após incubação da membrana por 12 h com a fração da peçonha total, houve reconhecimento de proteínas de alta massa molecular 150 kDa, assim como outras bandas presentes na peçonha total, principalmente nas posições 65 kDa e 14.3 kDa (Figura 14C). Quando o tempo de incubação da membrana com anticorpo foi reduzido para 1 h, somente a banda de 150 kDa foi detectada em condições não-redutoras, enquanto que em condições redutoras foram observadas várias bandas difusas de mobilidade não determinada e também a banda de 150 kDa (Figura 14D).

Para o screening da biblioteca com as duas frações de anticorpos e identificação de colônias, inicialmente placas SOLR contendo aproximadamente 1.000 colônias (Figura 15A) foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos da fração anti-lectina ou anti-peçonha total. A revelação ocorreu com tampão contendo fosfatase alcalina conjugada com anticorpos secundários (Figura 15B), seguindo o protocolo descrito na seção Métodos: “2.5.5. Screening da biblioteca com frações de anticorpos de *S. plumieri*”.

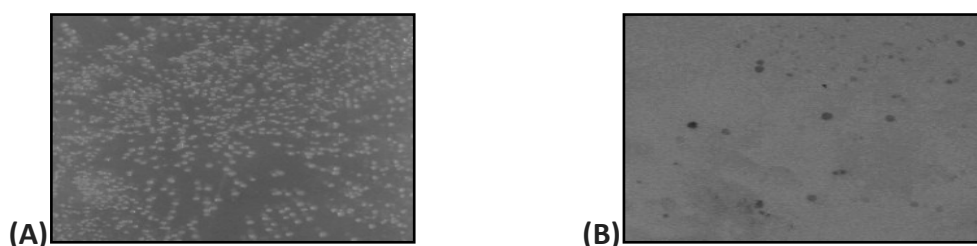


Figura 15: Identificação de clones positivos durante o screening com anticorpos. (A) Biblioteca de cDNAs de *S. plumieri* semeada em placas de Petri SOLR antes da transferência das colônias para membranas de nitrocelulose. **(B)** Identificação de colônias nas membranas de nitrocelulose após incubação com anti-peçonha total por 1 h a temperatura ambiente e reveladas com tampão contendo fosfatase alcalina acrescidos de substratos NBT e BCIP.

Após o screening de aproximadamente 10.000 clones com anticorpos produzidos contra a fração anti-lectina, 46 clones foram selecionados a partir da placa-mãe, enquanto que com o uso de anti-peçonha total foram recuperados 44 clones. Os plasmídeos das colônias que apresentaram reações positivas com cada tipo de

anticorpo foram purificados após inoculação das colônias em meio líquido. O DNA plasmidial foi quantificado por eletroforese em gel de agarose e os DNAs preparados para o sequenciamento.

O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando primers M13 e, depois da remoção de sequências de baixa qualidade com o auxílio do programa da Applied Sequence Scanner v1.0, as sequências foram editadas para formato Fasta. Após a edição, os insertos foram analisados com o auxílio do BLASTn e apresentados como ESTs. A figura 16 mostra um gráfico de barras do perfil da distribuição por tamanho das ESTs e classificadas com os seguintes tamanhos: 0.2-0.5 kb (48,9%), 0.5-1.0 kb (42,2%) e 1.0-2.0 kb (8,9%). Como é observado na figura 16, a distribuição de ESTs no screening com anticorpos é unimodal, prevalecendo maiores frequências de tamanhos para ESTs >400 bp, seguido por aqueles com tamanho > 500 bp.

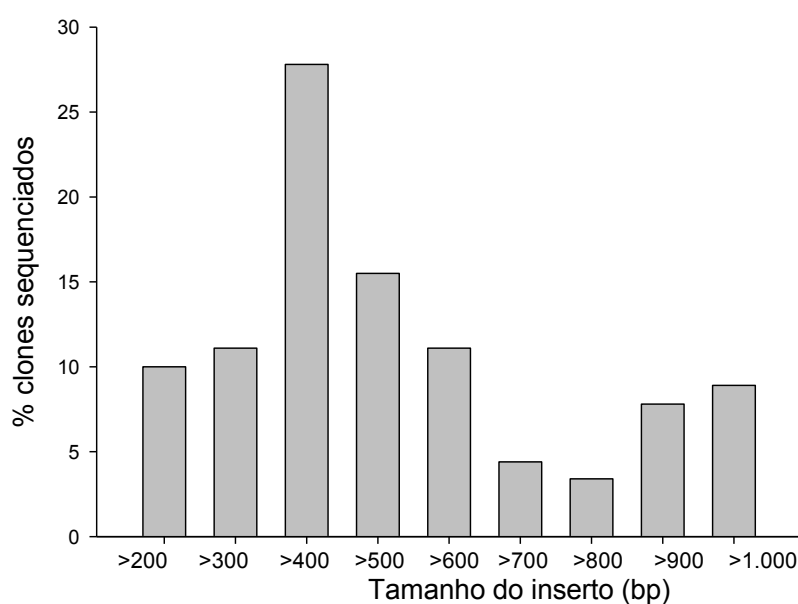


Figura 16: Distribuição do tamanho dos clones selecionados após screening com anticorpos anti-lectinas e anti-peçonha total. O intervalo das ESTs variou entre 200-1.000 bp.

Após a análise das distribuições não foram observadas diferenças significativas entre os clones selecionados com o uso das frações de anticorpos (anti-lectina e anti-peçonha total), dessa forma, as sequências foram reunidas e classificadas em

categorias utilizando a função atribuída para a sequência original no banco de dados, como descrito no screening randômico da biblioteca na seção 3.3.

A figura 17 mostra a distribuição das ESTs obtidas após screening com anticorpos. Os dados revelam novamente um número significativo de sequências desconhecidas pelo banco de dados (N= 25, 28%), seguido por (N= 22, 24%) de proteínas regulatórias e (N= 18, 20%) de proteínas sinalizadoras, sendo que destas (N= 15, 17%) foram alinhadas e identificadas como lectinas de peixes. Proteínas hipotéticas (como designadas no banco de dados) totalizaram (N= 11, 12%) e, por fim foram detectadas quantidades similares de proteínas metabólicas (N= 6, 7%) e estruturais (N= 7, 8%).

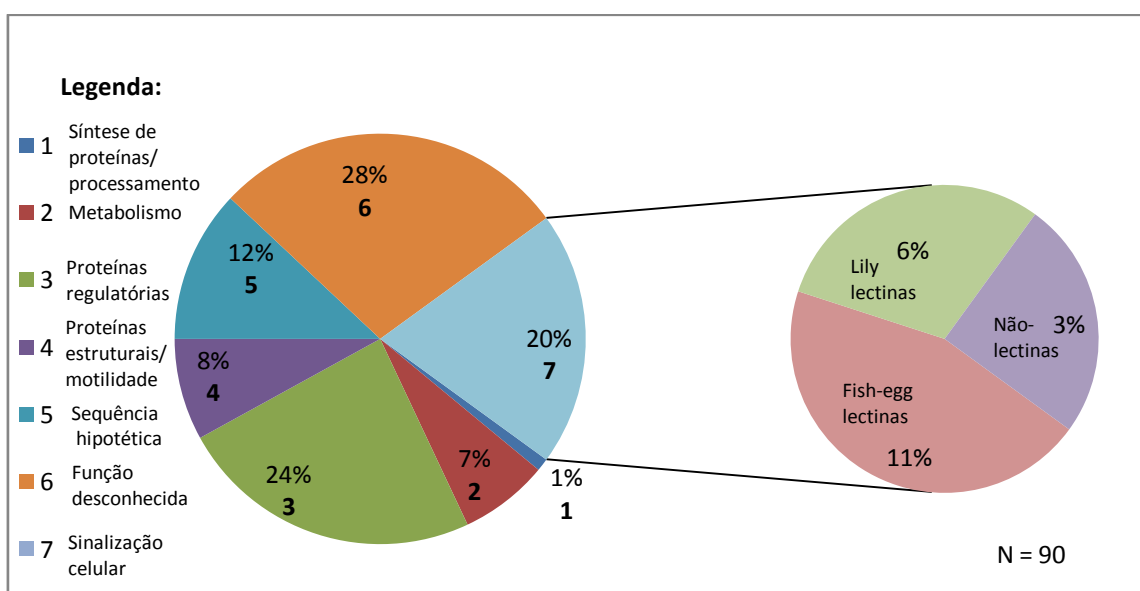


Figura 17: Classificação de ESTs após screening com anticorpos da biblioteca de *S. plumieri* baseado em suas semelhanças com funções descritas no BLASTn. Proporção relativa de cada categoria, sendo: **(1):** “Síntese de proteínas/ processamento” contêm transcritos que codificam proteínas ribossomais e de tradução; **(2):** “Metabolismo” contêm transcritos de proteínas presentes em mitocôndrias, enzimas do citosol, de fosforilação e de processos oxidativos; **(3):** “Proteínas regulatórias” contêm genes que codificam fatores de transcrição e proteínas da regulação gênica; **(4):** “Proteínas estruturais/motilidade” incluem proteínas do citoesqueleto e componentes da matriz extracelular; **(5):** “Sequência hipotética” incluem ESTs preditas como proteínas hipotéticas; **(6):** “Função desconhecida” contêm todas aquelas ESTs cujas sequências

não foram encontradas no banco de dados; **(7)**: “Sinalização celular” compreende proteínas de ligação, tráfico intracelular ou proteínas sinalizadoras.

Durante o screening com anticorpos, foram selecionadas 51 ESTs que apresentaram scores ≥ 80 com sequências obtidas no banco de dados BLASTn. A tabela 8 relaciona a lista dessas ESTs com as anotações identificadas, o número de acesso do GeneBank, o valor de E-value e score, a identidade da sequência alvo e o número de vezes que cada EST foi identificada.

Tabela 8: Lista representativa de ESTs matches com BLASTn de clones obtidos após screening com anticorpos de *S. plumieri* ($\leq 10^{-10}$, score ≥ 80).

Grupo	HIT ID	E-value (score)	Identidade	Nº de ESTs
Metabolismo				
	KF725093.1	0.0 (723)	Mitochondrion	4
	DQ900715.1	5e-147 (531)	Cytochrome c oxidase subunit II	1
	JF694445.1	1e-36 (163)	Glutamate dehydrogenase	1
Estrutural/Motilidade				
	DQ324363.1	0.0 (785)	Collagen, type 1, alpha 1	2
	XM003442932.2	4e-101 (377)	Collagen alpha-1 (X) chain-like	1
	AB045975.1	3e-87 (331)	Pro-alpha 1 type V/XI collagen	1
	XM005467183.1	3e-74 (289)	Myomesin-2-like	1
Sinalização celular				
	GU988616.1	7e-161 (577)	Annexin A11	1
	AB201746.1	3e-113 (418)	Lily-type lectin	5
	AB618145.1	9e-86 (393)	Fish-egg lectin	10
	XM003455599.2	8e-65 (257)	Felin leukemia virus subgroup C	1
	BT082384.1	6e-44 (187)	Annexin A5	1
Regulatórias				
	BT083326.1	0.0 (671)	Lipocalin	3
	XM003978381.1	2e-57 (233)	Gelsolin-like	1
	JQ247584.1	1e-17 (197)	Gonadotropin-releasing hormone 3	2
	XM006804535.1	5e-44 (187)	Nuclear ribonucleoprotein A0-like	1
	XM004540396.1	1e-35 (161)	Leucine zipper protein 1-like	1
	XM006785279.1	3e-13 (134)	Calcitonin	1
	XM004544958.1	3e-19 (105)	Retinoic acid receptor gamma-A-like	12
	XM003449799.2	2e-12 (84.2)	Calpain small subunit 1-like	1

Essa lista ordenada em categorias contém 13 (25%) de cópias únicas e 38 (75%) correspondendo a duas ou mais cópias identificadas na biblioteca. ESTs categorizadas no grupo “Metabolismo” tiveram valores de E-value e score que variaram entre 0.0 (723) e 1e-36 (163), enquanto que o grupo “Estrutural/Motilidade” variou entre 0.0

(785) e 3e-74 (289) e o grupo “Sinalização celular” variou entre 7e-161 (577) e 6e-44 (187). Por fim, o grupo “Regulatórias” variou entre 0.0 (671) e 2e-12 (84.2).

Do total de clones sequenciados (N= 90), 10 (11%) das ESTs apresentaram fortes matches (score > 401), enquanto que 18 (20%) tiveram matches com scores entre 201-400, 36 (40%) com scores entre 80-200. ESTs que não tiveram matches no BLASTn ou foram menores que 80 totalizaram 26 (29%).

O screening da biblioteca com as frações anti-lectina e anti-peçonha total produziram o mesmo número de ESTs (N= 5) semelhantes com lectinas de ovos de peixes. As ESTs analisadas com a ferramenta BLASTn mostraram similaridades equivalentes com as lectinas de *Oplegnathus fasciatus*, *Dicentrarchus labrax*, *Maylandia zebra* e *Oreochromis niloticus*. Uma sequência consenso lectina-like de 801 bp produziu uma ORF de 267 resíduos, a qual foi alinhada com as lectinas descritas nessas espécies e é mostrada na figura 18. Quando todas essas lectinas foram analisadas e comparadas com as lectinas obtidas com o screening randômico também foi observado anotações semelhantes.

```

Scorpaena plumieri      -----PNTLTGKGGLELHRRGGGRSRTSGTPGLQEFGRTRAKQIDAGAGLVVSTTRI
Oplegnathus fasciatus   MCIAGYTLRDDMKAAAFLLVLCYLAVSQAWNCKEAPQQYP--ALQIDAGQGKVVLTDKN 58
Dicentrarchus labrax    -----MKAVAAFLVLVLCYLAASHAWTCKEPPSLYG--AVQIDAGQGKVVARDN 47
Maylandia zebra         -----MKSFAAFLVLVLSYPFVSHGCTCTEGPQQFP--AVQIDAGQGNVMTDSN 47
Oreochromis niloticus   -----MKAIAALLMLNLSVGHGGICMEGPQQFP--AVQIDAGQGKVVMTDSN 47
                        * *                               : * * * * * * * *

Scorpaena plumieri      HFAYMLVNGFWIRLSTI-RVRHVTVGKAGIWAAGKFNKVRYLRCGRFRHAKGKSMKQVDA
Oplegnathus fasciatus   HNAYFLSGSTWYRLGSY-SLKHVSVGPAGIWDVTSNKVKYVAGNFLLSNGPMSMLQVDA 117
Dicentrarchus labrax    YYAYFLSGTTWQRLGSYRALKHVSVGPAGIWDVTSNRVHKYVAGNFKLSSGGYMQQVDA 107
Maylandia zebra         NYAYFLGSQWYKMGSL-TLKHVSVGPAGIWDVLDLDRVYKVVAGSFVFANGESLQQVDA 106
Oreochromis niloticus   NYAYFLIGSQWYKMGSL-TLKHVSVGPAGIWDVLDLNNRVYEVAGSFVFANGESLRQVDA 106
                        **:* * : : : : ** * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * :

Scorpaena plumieri      GGHCNIVGVTPTNQANCLRKQHAFNGNGALFWKVIIRNFRMTKYISTTFNGRSPSPWGV
Oplegnathus fasciatus   GGNQGVVGVSNSTYNYCLRSTFASAYRKVGSLSLWNSLS---RVVKYVSCGP--LYGCWGV 172
Dicentrarchus labrax    GGDGQVVGNNYAYCLRSTYASVYRGSGSLRWSSLG---RIMRYVSCSP--LNGCWGV 162
Maylandia zebra         GGDGQVVGVTDTSTIHLKSTIASAYREQSTLSWTLP---GLLMYVSCSS--KYGCWGV 161
Oreochromis niloticus   GGDGQVVGVTDTSTIHLQSTIASVYREQSTLSWTLP---GLLMYVSCST--KYGCWGV 161
                        ** : : * * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Scorpaena plumieri      LSNHKVVCSSQVSNSTKIFSRWKIVKGLLTMVEVGNDDGTVVGVTIKIGKVVQRLGISKRF
Oplegnathus fasciatus   DASDRIYFTQRIIPTTCGTSQWQISGSAKMVEVGTGTVFTVNRQGLVVFQRTGIYNGRP 232
Dicentrarchus labrax    DTSNRIYFTQRIPTTCSISGWVRVSGSAKMVEVGTGDNVFMGLVDGRVYQVYQAGISSRP 222
Maylandia zebra         NSVQNIYFTR-VTPSTCGISGWIQVDGLAVMVEIGTDGSVFVNRGGEVFRQQRGIDSSTP 220
Oreochromis niloticus   NSAENIYFTK-VTPSTCGISDWIHVDGLAVKVETGTDGSVFVNRVGEVYQVYQQRGIDSRT 220
                        : : : : * * * * : * * * * * : * * * * * *

Scorpaena plumieri      HGTSWKYVPMCMAIRHVTVYDGNLWAVSRTGFIFKCR
Oplegnathus fasciatus   QGSGWTQVSMCMKINHVSYDLGNLWAVTSGLLFQCTH 270
Dicentrarchus labrax    YGTSWTRINLCLPIHVSYDLGNL----- 246
Maylandia zebra         QGTSWTKIPMPSRINHVSYDRGNLWVVTDYGTILKCF 258
Oreochromis niloticus   QGTSWTKIPMPSRISHVSYDRGNLWVVTDNGTILKCLY 258
                        * : * : : * * * * * *

```

Figura 18: Alinhamento de ESTs de *S. plumieri* com lectinas-like utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2. A numeração dos aminoácidos é referente a outras lectinas-like caracterizadas em peixes. *identifica resíduos idênticos; : identifica um

resíduo conservado; resíduos sublinhados = sítios invariáveis; sublinhado IRLS = sítio de N-acetilação: Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank nucleotide sequence databases): lectina de ovo de peixe de *Oplegnathus fasciatus*, BAL618145; lectina de ovo de peixe de *Dicentrarchus labrax*, CBK52298; lectina de ovo de peixe de *Maylandia zebra*, XP004574029 e lectina de ovo de peixe de *Oreochromis niloticus*, XP003443389.

Durante o screening com anticorpos, foram identificadas outras ESTs (N= 5) que também codificam para lectinas putativas. Destas, 3 ESTs surgiram do screening com a fração anti-lectinas e 2 ESTs com a fração anti-peçonha. A sequência consenso das ESTs geraram uma ORF de 348 bp a qual foi traduzida em um peptídeo hipotético de 116 aminoácidos (Figura 19) que apresentou massa molecular estimada de 13.3 kDa e pI de 6,55. A sequência não contém peptídeo sinal nem regiões transmembrânicas, embora contenha domínio de ligação com manose tipo-Bulp (B-lectina). A proteína putativa identificada foi designada SpLTL-1 (*Scorpaena plumieri* Lectina Tipo Lily-1).

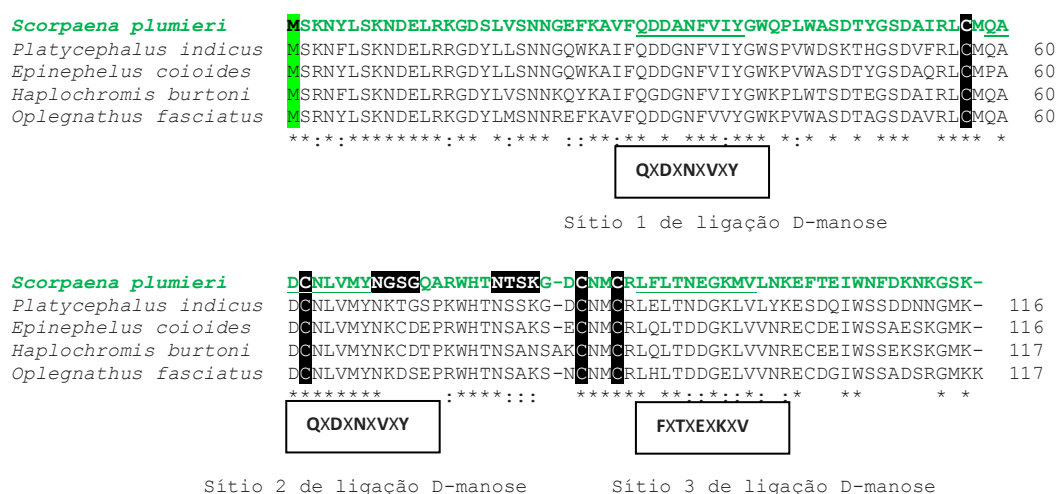


Figura 19: Alinhamento de SpLTL-1 com lily-lectinas utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2. As posições dos aminoácidos são referentes a outras lectinas caracterizadas em peixes e estão mostrados à direita. Deleções são indicadas por traços. *identifica resíduos idênticos; : identifica um resíduo conservado. Sequências em box NGSG e NTSK = Sítio potencial de N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr). Três sítios de ligação D-manose estão sublinhados e representados por caixas. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank): Lily lectina de *Platycephalus indicus*, BAE79274.1; Lily lectina

de *Epinephelus coioides*, AEA39736.1; Proteína não caracterizada de *Haplochromis burtoni*, XP005922607.1; Lily lectina-2 de *Oplegnathus fasciatus*, ADV35592.1.

Análises da sequência SpLTL-1 mostra identidade com outros membros de superfamílias de lectinas incluindo tipo lily lectina, lectinas de muco e lectinas de ligação a manose presentes em diferentes peixes. Os resultados revelam alta identidade (72%) para lily lectina do peixe Scorpaeniforme *Platycephalus indicus*, seguido de alinhamento forte com membros de lectinas homólogas encontradas em *Epinephelus coioides*, *Haplochromis burtoni* e *Oplegnathus fasciatus* (Figura 19).

O uso do servidor PSIPRED (UCL Department of Computer Science) confirmou a presença de três folhas β curtas (4-5 resíduos) internas nesses motivos, semelhante à lily lectina, CsLTL-1 de *Channa striatus* (ARASU et al., 2013). Análises da estrutura secundária de SpLTL-1 revelam que a proteína contém aproximadamente 47% (55 resíduos) em folhas β , 53% (61 resíduos) de enovelamentos ao acaso e nenhuma α -hélice foi predita. A predição de ligação com manose foi realizada por comparação da estrutura primária de SpLTL-1 com sequências de outras lily lectinas caracterizadas em peixes e pesquisadas no banco de dados (NCBI).

Em SpLTL-1, foram identificados três sítios de ligação de manose nas posições 30, 58 e 90 do motivo representado por QxDxNxVxY presentes em três folhas beta. As repetições encontradas em SpLTL-1 foram: repetição 1 nas posições Gln-30, Asp-32, Asn-34, Val-36, Tyr-38; repetição 2 nas posições Gln-59, Asp-61, Asn-63, Val-65, Tyr-67 e repetição 3 com alterações nas posições Phe-91, Thr-93, Glu-95, Lys-97, Val-99 (Figura 19).

Para elucidar as relações evolucionárias de SpLTL-1 com lectinas de outras espécies, análises filogenéticas foram realizadas utilizando a sequência traduzida *in silico* e comparada com quatro lectinas representativas do tipo lily (Figura 20). A árvore formou três clados diferentes, um somente com a lectina do peixe *Oplegnathus fasciatus*, o segundo clado formado por lectinas dos peixes Scorpaeniformes *Platycephalus indicus* e *S. plumieri* e, por fim, o terceiro clado constituído pelas espécies dos peixes *Epinephelus coioides* e *Haplochromis burtoni*.

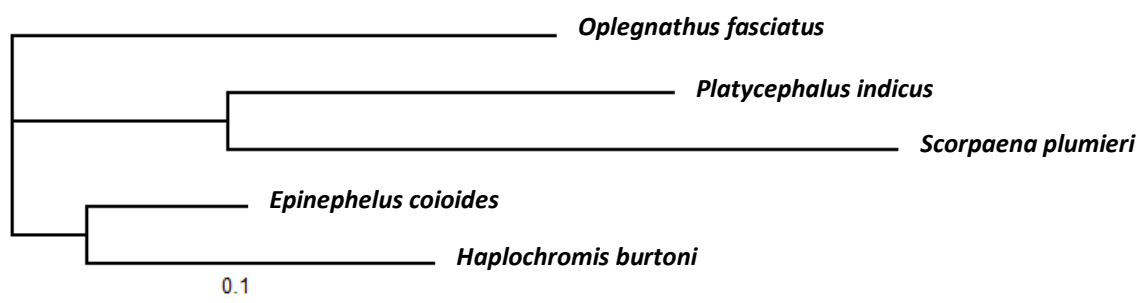


Figura 20: Árvore filogenética da lily-lectina de *S. plumieri* (SpLTL-1). A árvore foi gerada pelo algoritmo ClustalX 2.1 (THOMPSON et al., 1994) combinado com o programa TreeView (PAGE 1996) e construída pelo método Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância genética de 0.1 como a frequência de substituições em comparações aos pares entre duas sequências. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank): Lily lectina de *Platycephalus indicus*, BAE79274.1; Lily lectina de *Epinephelus coioides*, AEA39736.1; Proteína não caracterizada de *Haplochromis burtoni*, XP005922607.1; Lily lectina-2 de *Oplegnathus fasciatus*, ADV35592.1.

3.5. Análise da qualidade e redundância da biblioteca de *S. plumieri*

Para avaliar as características da biblioteca de *S. plumieri* após a realização dos métodos de screening, 12 parâmetros foram examinados, como sugeridos por Adams e colaboradores (1995). São eles:

- 1- % de sequências de boa qualidade
- 2- % de clones sem inserto
- 3- % de sequências contaminantes (outros organismos)
- 4- % de clones correspondentes a RNA ribossomal
- 5- % de clones correspondentes a DNA mitocondrial
- 6- % de ESTs com homologia a nível de nucleotídeos com genes descritos para *S. plumieri* (Classe 1)
- 7- % de ESTs com homologia > 95% em nível de nucleotídeos com genes de peixes (Classe 2)
- 8- % de ESTs com homologia < 95% em nível de nucleotídeos com genes de peixes (Classe 3)
- 9- % de ESTs com melhor match para genes de outros organismos (Classe 4)

10- % de ESTs sem homologia significativa com sequências depositadas em banco de dados

11- % de ESTs correspondentes a genes novos (soma das ESTs dos parâmetros 8, 9 e 10)

12- % de ESTs provenientes da região 3' do cDNA que contém cauda de poli A

A figura 21 mostra a distribuição dos parâmetros avaliados para um total de 942 ESTs obtidas com os métodos de screening utilizados: screening randômico, screening com anticorpos e screening com radioativo, sendo este último descrito no apêndice desse trabalho.

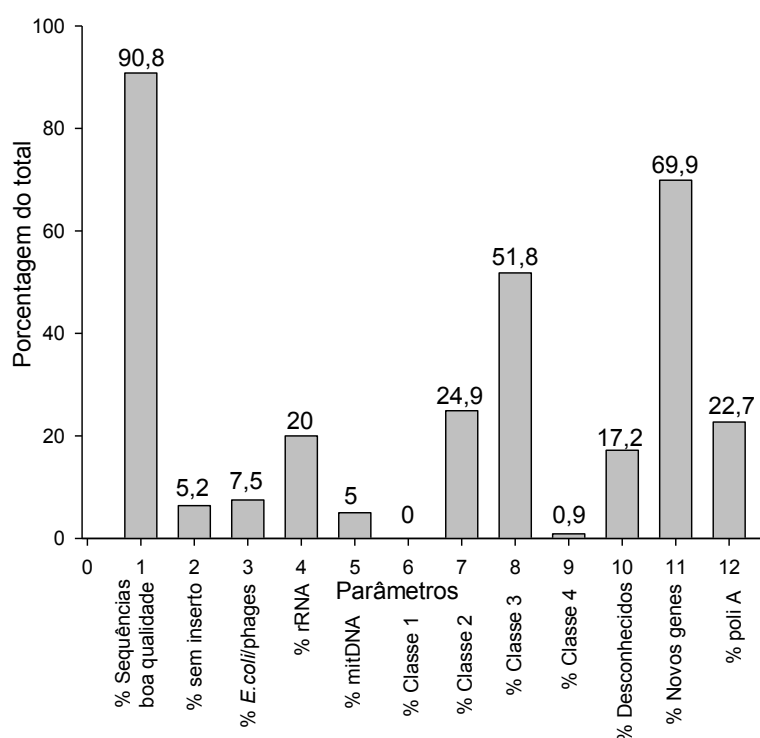


Figura 21: Controle da qualidade da biblioteca de *S. plumieri*. O gráfico de barras mostra a distribuição em porcentagens de ESTs (eixo y) avaliadas para cada parâmetro analisado (eixo x).

O parâmetro 1 avalia a qualidade do DNA molde assim como a qualidade do sequenciamento. A alta quantidade de ESTs observadas (N= 856, 90,8%) está relacionada à obtenção de DNAs bem purificados e com protocolos adequados para

sequenciamentos utilizando a plataforma ABI3130. Para a análise da qualidade das sequências obtidas utilizou o programa ChromasPro Versão 1.5 e também o programa disponível da Applied Biosystems (Sequence Scanner v1.0). Foram consideradas sequências de boa qualidade aquelas em que ao menos 80% da sequência apresentou um valor QV (Valor de Qualidade) acima de 10-20, o que corresponde a uma probabilidade de erro da base identificada não superior a 10%.

Apesar da realização da purificação de cDNAs para selecionar os insertos, foi verificado que 48 clones (5,2%) não continham DNA clonado após sequenciamento (Parâmetro 2). Durante os screenings, foram encontrados 71 clones (7,5%) contaminantes contendo sequências principalmente de *E. coli* (Parâmetro 3) e 189 clones (20%) que alinharam com sequências da subunidade 16 S de RNA ribossomal (Parâmetro 4). Sequências relacionadas à DNAs de mitocôndrias totalizaram 48 clones e corresponderam a 5% da biblioteca total (Parâmetro 5).

De todas as ESTs obtidas, nenhuma (Parâmetro 6) alinhou com sequências de *S. plumieri*, como já era esperado, visto que ainda não há depósitos de sequências referentes a esse organismo. Apesar disso, utilizando a ferramenta BLASTn, 24,9% (235 ESTs) alinharam com homologia >95% com genes de peixes (Parâmetro 7), 51,8% (488 ESTs) alinharam com homologia <95% com genes de peixes (Parâmetro 8) e somente 0,9% (9 ESTs) tiveram match com sequências de organismos não pisciformes (Parâmetro 9). Um total de 162 ESTs (17,2%) foram classificadas como genes desconhecidos, já que não alinharam com sequências conhecidas no banco de dados (Parâmetro 10).

Em relação a novos genes encontrados na biblioteca de *S. plumieri*, foram obtidas aproximadamente 659 ESTs, o que correspondeu a quase 70% de todos os clones (Parâmetro 11). Foi verificado que 214 ESTs (22,7%) continham cauda poli A (Parâmetro 12) e com comprimento médio que variou de 18-20 bp. Por outro lado, aproximadamente 50% (471 ESTs) continham uma fita de poli T no início da sequência, indicando o sucesso da clonagem durante a construção da biblioteca.

A tabela 9 resume as informações sobre as características do sequenciamento da biblioteca de *S. plumieri*. Foram sequenciadas um total de 942 ESTs e após remoção de sequências advindas de *E. coli*, rRNA ou DNA mitocondrial e clones sem insertos, restaram 573 ESTs apropriadas para análises com a média de tamanho de 0.5-0.7 kb.

Destas, 356 foram obtidas pelo screening randômico da biblioteca, 90 através do screening com anticorpos e 127 pelo screening da biblioteca com sonda radioativa (relatados no apêndice desse trabalho). Utilizando os diferentes métodos de screening, 233 ESTs foram classificadas de acordo com a similaridade (scores ≥ 80) quando pesquisadas no banco de dados BLASTn.

Tabela 9: Distribuição das ESTs da biblioteca de *S. plumieri*.

Número total de ESTs	942
Número de sequências desejáveis (ambas as direções)	573
Número de ESTs representativos	233
Número de genes desconhecidos	162
Número de genes diferentes	95
Média do tamanho das ESTs	0.5-0.7 kb
Comprimento médio da cauda poli A	18-20 bp

De um total de 342 ESTs identificadas com base em sua similaridade com sequências de peixes, especialmente da Ordem dos Perciformes, foram identificadas 95 ESTs diferentes, das quais, 67 (70,5%) foram identificadas somente uma vez e correspondem à categoria não-redundante, enquanto que as 28 (29,5%) ESTs restantes foram sequenciadas mais de uma vez e pertencem à categoria redundante, perfazendo um total de 275 sequências. A figura 22 mostra a frequência encontrada para os componentes do grupo redundante.

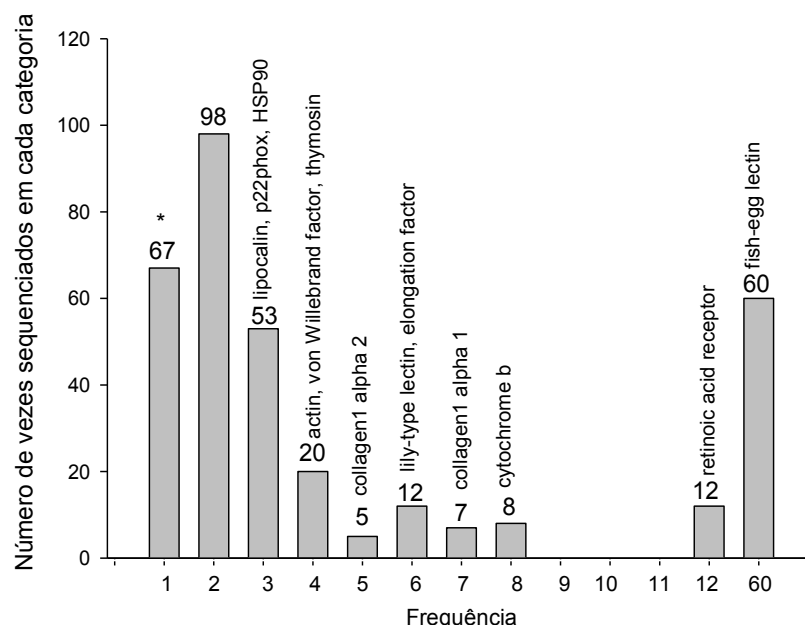


Figura 22: Frequência das ESTs sequenciadas na biblioteca de *S. plumieri*. O gráfico de barras mostra a frequência com que as ESTs foram encontradas. A frequência variou entre 1 a 60. Frequência 1 corresponde a ESTs que foram sequenciadas uma vez na biblioteca. *Representa o grupo não-redundante.

A frequência de ESTs que codificam para lipocalinas, p22phox e HSP90 foram encontradas em três instâncias para cada um deles. Genes, com frequência de 4 foram relatados para a actina, fator de von Willebrand e timosina, já a frequência de 5 ocorreu para o gene estrutural colágeno-1 alfa-2 e a frequência de 7 para colágeno-1 alfa-1. Grupos com frequências de 6 foram observados para lectinas do tipo lily e fatores de alongação e aquelas com frequência igual a 8 foi o citocromo b. ESTs com frequência superior a 8 foram o receptor retinóico (N= 12) e lectina de ovo de peixe – fish egg lectin (N= 60).

3.6. Clusterização das ESTs encontradas na biblioteca de *S. plumieri*

As 942 ESTs obtidas foram submetidas ao programa CAP3 que permite reunir ESTs de alta qualidade em contigs e singlets a partir da sobreposição de ESTs compondo uma sequência consenso. A biblioteca se agrupou em 639 uniques e, após remoção das sequências de *E. coli*, DNA mitocondrial e RNA ribossomal, restaram 506

(Tabela 10), dos quais 40 são contigs e 466 singlets. Em seguida, aplicando o algoritmo BLAST2GO e com a ferramenta BLASTx (E-value < $1,0 \times 10^{-10}$), foi realizada a anotação funcional, o mapeamento ontológico (GO) e a identificação de vias de sinalização através do KEGG.

A análise dos clusters de ESTs utilizando o banco de dados BLASTx não-redundante indicou que 143 uniques (24 contigs e 119 singletons) codificam para proteínas conhecidas. Os restantes 363 (16 contigs e 347 singletons) com E-value > 1×10^{-10} foram designados como transcritos sem match em banco de dados e provavelmente representam novas proteínas. Foi verificado assim que grande proporção das ESTs não possui anotação, mesmo quando analisadas em uma base funcional como do Kegg Orthology (KO).

Tabela 10: Relação dos clusters obtidos da biblioteca de *S. plumieri*.

		% do total*
Número total de uniques	639	
Número de uniques desejáveis	506	
Número de contigs	40	7,9
Número de singlets	466	92,1
Número de proteínas conhecidas	143	28,2
Número de genes desconhecidos e sem hit	363	71,8

*Se refere ao total de uniques desejáveis: N= 506.

Os clusters encontrados cujas sequências foram previamente identificadas e com funções conhecidas foram classificados em sete categorias funcionais (Figura 23). Se um determinado cluster possui múltiplas funções, então a classificação foi feita baseando na função putativa principal.

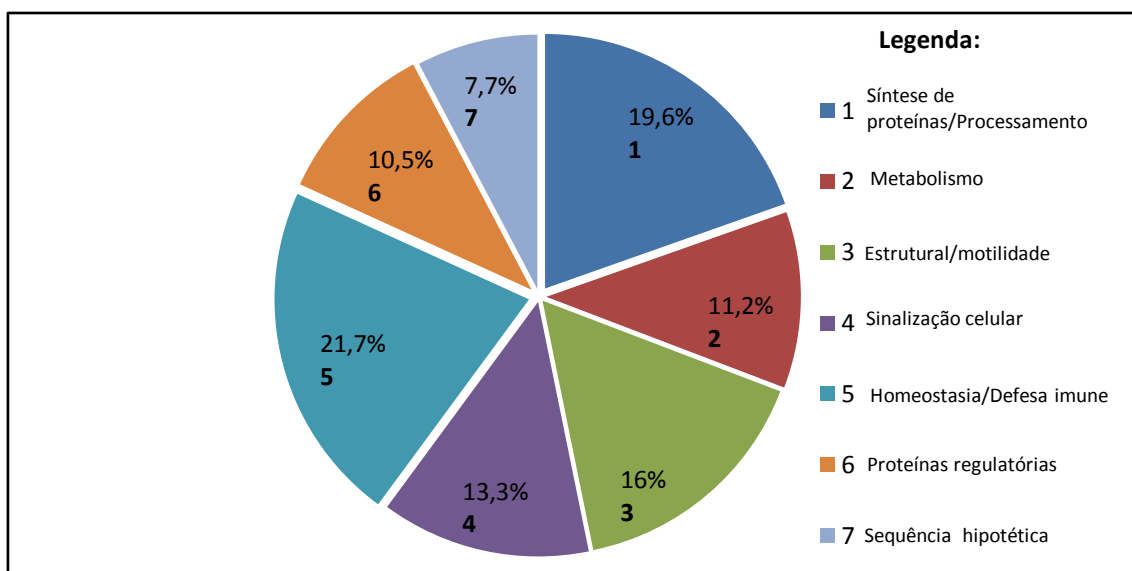


Figura 23: Classificação funcional dos clusters da biblioteca de *S. plumieri* com base nas similaridades funcionais descritas em banco de dados (BLAST2GO/NCBI). Na figura a proporção relativa de cada categoria representada é: **(1):** “Síntese de proteínas/Processamento” contêm transcritos que codificam proteínas ribossomais e de tradução; **(2):** “Metabolismo” contém transcritos de proteínas presentes em mitocôndrias; enzimas do citosol, de fosforilação e processos oxidativos; **(3):** “Estrutural/motilidade” incluem proteínas do citoesqueleto e componentes da matriz extracelular; **(4):** “Sinalização celular” compreende proteínas de ligação, tráfico intracelular ou proteínas sinalizadoras; **(5):** “Homeostasia/Defesa imune” contêm genes relacionados a mecanismos relacionados aos sistemas imune e homeostático; **(6):** “Proteínas regulatórias” contêm genes que codificam fatores de transcrição e proteínas da regulação gênica e **(7):** “Sequência hipotética” inclui clusters preditos como proteínas hipotéticas.

Os clusters mais abundantes foram categorizados de acordo com a função celular como segue: “Homeostasia/Defesa imune” (21,7%), seguido por clusters com genes envolvidos na síntese de proteínas e processamento que totalizaram 19,8%, sendo a maioria formada por proteínas ribossomais. Proteínas “estruturais e de motilidade” corresponderam a 16% dos clusters e proteínas sinalizatórias perfizeram 13,3%. Os menos abundantes pertencem às funções “metabolismo” (11,2%), “proteínas regulatórias” (10,5%) e “proteínas hipotéticas” (7,7%), como mostradas na figura 23.

A tabela 11 mostra a distribuição de um total de 820 ESTs e sua relação com os 506 clusters obtidos. Foi verificado que 28 clusters associados com síntese de proteínas e processamento correspondiam a 39 ESTs e perfizeram 4,7% da biblioteca. Os 31 clusters categorizados em genes do sistema imune corresponderam a 79 ESTs, 16 clusters da categoria metabolismo corresponderam a 80 ESTs e as sequências hipotéticas formaram 11 clusters contendo 81 ESTs. Na categoria estrutural e motilidade foram identificados 23 clusters com 46 ESTs e na categoria sinalização celular, 19 clusters correspondendo a 36 ESTs. Um total de 135 clusters apresentaram match com sequências de funções desconhecidas contendo 162 ESTs, categorizados como “proteínas não caracterizadas”. Por fim, a categoria nomeada de “no hit” contém o maior número de clusters (N= 228) e incluem 247 ESTs sem identidade com sequências anotadas no banco de dados.

Tabela 11: A distribuição dos clusters identificados em *S. plumieri* e sua relação com as ESTs obtidas.

Função celular	Nº clusters	Nº ESTs	% total Transcritos*
Síntese de proteínas/processamento	28	39	4,7
Metabolismo	16	80	9,8
Estrutural/motilidade	23	46	5,6
Sinalização celular	19	36	4,4
Homeostasia/defesa imune	31	79	9,6
Proteínas regulatórias	15	50	6,1
Proteínas hipotéticas	11	81	9,9
Não caracterizadas ^φ	135	162	19,8
No hit ^Δ	228	247	30,1
Total	506	820	100

*Se refere a ESTs (N= 820).

^φSe refere aos clusters que alinham com sequências de funções desconhecidas.

^ΔInclui os clusters sem identidade com sequências conhecidas.

Nesse estudo foi estabelecida uma relação entre as ESTs e seus clusters (ESTs/Clusters). Como ilustrado na tabela 12, as sequências com similaridade com lectinas de ovos de peixes representam 10,5% ESTs (Grupo 1) e média de 6

ESTs/Clusters, a mesma relação foi obtida para a lectina tipo lily (Grupo 8) e para a timosina (Grupo 9), as duas últimas representados por um único cluster. Do total de 28 clusters relacionados com síntese de proteínas e processamento, 22 deles (Grupos 2 e 4) correspondem a proteínas ribossomais. Como mostrado na tabela 14, a grande maioria dos grupos contém um único cluster com número variável de ESTs.

Tabela 12: Classificação dos clusters e a relação ESTs/Clusters.

Grupo	Nº de clusters	Nº de ESTs	ESTs/ clusters	% do total*	Putativa identificação
1	10	60	6	10,5	Fish-egg lectin
2	12	29	2,4	5,0	60 S ribosomal L
3	04	13	3,2	2,2	Collagen, alpha 1
4	10	10	1	1,7	40 S ribosomal
5	06	08	1,3	1,4	Cytochrome c oxidase II
6	07	08	1,1	1,4	Cytochrome b
7	03	06	2	1,0	Elongation factor 1-alpha
8	01	06	6	1,0	Lily-type lectin
9	01	06	6	1,0	Thymosin
10	05	05	1	0,8	Collagen, alpha 2
11	01	05	1	0,8	Keratin
12	01	04	4	0,7	β actin
13	01	03	3	0,5	HSP90
14	02	03	1,5	0,5	Guanine nucleotide binding
15	01	03	3	0,5	Lipocalin
16	01	03	3	0,5	Mannose lectin
17	01	03	3	0,5	ADP/ATP translocase
18	02	02	1	0,3	HSP70
19	01	02	2	0,3	Aryl hydrocarbon receptor
20	01	02	2	0,3	Myosin
21	01	02	2	0,3	S-100 like protein
22	01	02	2	0,3	N-acetylgalactosaminyl

*Se refere ao total de ESTs utilizadas (N= 573)

Durante as análises também foi elaborada uma tabela das ESTs que faziam parte de um único cluster (Tabela 13).

Tabela 13: Relação das ESTs não-redundantes que pertencem a um único cluster.

HIT ID	Putativa identificação (1 EST/Cluster)
BT083258.1	p-21-activated protein kinase
FJ826528.1	Malate dehydrogenase
AF263276.1	Alpha tubulin
AB490880.1	Ferritin heavy chain
BT083320.1	MANBAL
XM003442283.2	ADM-like
XM004543212.2	Cleavage and polyadenylation specificity factor
XM003449910.1	T-complex protein 1 subunit alpha
XM003441063.1	PDZ and LIM domain protein
XM003449701.1	Arfaptin-like
XM003451520.1	Thrombospondin-4-B-like
XM006796040.1	GRB2-associated-binding protein 1-like
XM003455599.2	Feline leukemia virus subgroup C
HQ441029.1	Poly A binding protein, cytoplasmatic 1b
XM003454129.1	Protein tyrosine phosphatase type IVA
FJ629181.1	Kinase I
XM003449453.1	SUN domain protein
XM003449090.1	Angiopoietin
BT082582.1	Proteasome subunit alpha type 3
XM003442398.1	Coronin-1A-like
FJ800037.1	Apolipoprotein E
XM003452967.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2

Em relação à distribuição inicial das ESTs, muitas apresentam forte identidade com a ferramenta BLASTn (nr/nt), mas não aparecem nas análises utilizando o Gene Ontology (GO) e Kegg Orthology (KO). A tabela 14 mostra uma lista de ESTs excluídas das bases de dados GO e KO que foram identificadas na análise inicial da biblioteca, utilizando BLASTn, das quais aproximadamente 50% tiveram scores $\geq$ a 200.

Tabela 14: Lista de ESTs excluídas das bases de dados funcionais Gene Ontology (GO) e Kegg Orthology (KO).

ESTs não contempladas em bases 2 ^a (GO, KO)*	E-value (escore)
QM-like protein	0.0 (776)
Antifreeze glycoprotein	1e-40 (682)
Chaperonin subunit 7	2e-177 (632)
Annexin A11	7e-161 (577)
MYC binding protein 2	7e-161 (577)
IRF-1	1e-142 (516)
Peripheral myelin	7e-136 (494)
Cold-inducible RNA-binding protein	2e-132 (481)
p22phox	4e-116 (428)
Double-strand-break repair protein rad21	4e-116 (427)
Intermediate filament protein ON3	9e-100 (374)
Krueppel-like factor 6	1e-85 (326)
MDA5 gene	1e-69 (273)
C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	6e-62 (248)
Fibronectin-like	4e-52 (215)
Von Willebrand factor A domain	1e-27 (200)
Gonadotropin-releasing hormone 3	1e-17 (197)
D1c dopamine receptor	8e-45 (190)
Nuclear ribonucleoprotein A0-like	5e-44 (187)
Annexin A5	6e-44 (187)
Hemolytic toxin Avt-1-like	5e-39 (171)
MHC class Ia antigen	3e-13 (166)
Glutamate dehydrogenase	1e-36 (163)
Leucine zipper protein-1-like	1e-35 (161)
Profilin-2	3e-31 (145)
Calcitonin	3e-13 (134)
Ras-related protein Rab-10	6e-27 (131)
Integrin alpha-6-like	2e-26 (129)
Akirin 2	2e-10 (128)
Solute Carrier family 26	1e-20 (109)
Retinoic acid receptor gamma-A-like	3e-19 (105)
Calcyclin-binding protein	2e-18 (104)
TRAF4 protein	2e-16 (96.9)
Haplotype 2 AFGP/TLP	2e-12 (84.2)
Calpain small subunit 1-like	2e-12 (84.2)
Cofilin-2	2e-11 (80.6)

*Análises das ESTs foram realizadas com a ferramenta BLASTn e coleção de nucleotídeos não-redundantes (nr/nt), (E-value $\leq 10^{-10}$, score ≥ 80).

Por outro lado, as bases de dados GO e KO identificaram anotações não descritas com a ferramenta BLASTn. A tabela 15 mostra as anotações exclusivamente encontradas nas bases de dados do GO e KO. Essa lista mostra que todos os clusters foram encontrados no GO não-redundante, 5 clusters foram identificados também na base de dados KO e nenhum cluster foi exclusivo na base de dados KO.

Tabela 15: Lista de clusters contemplados em bases de dados Gene Ontology (GO) e/ou Kegg Orthology (KO).

Clusters contemplados em bases 2 ^a	(GO)	(KO)	E-value*	Nº de clusters
Type II cytoskeletal 8-like	+	+	0.0	02
mce-related partial	+	-	6,9e-136	01
α2-macroglobulin	+	-	2,0e-129	01
Protein fam171a1	+	-	3,3e-82	01
Dihydroxy-2-butanone 4-phosphatase	+	+	2,4e-75	01
Type I cytoskeletal 13-like	+	+	3,3e-58	02
Inositol monophosphatase	+	-	2,6e-57	01
Ferric quelate reductase 1-like	+	-	8,9e-43	01
f420 dependent oxidoreductase	+	+	7,5e-39	01
Chk1 checkpoint-like partial	+	-	2,6e-37	03
Hatching enzyme	+	-	1,7e-36	01
Piezo-type mechanosensitive	+	-	5,8e-34	01
Muscle 2 4 4a	+	-	2,2e-34	01
Protein nyrin-like	+	-	7,9e-29	01
Pol polyprotein	+	-	4,5e-28	01
Gametogenetin-binding protein	+	+	3,8e-27	01
Hemagglutinin amebocyte	+	-	2,8e-20	01
Probable global transcription	+	-	2,9e-18	01
Perforin-1-like	+	-	2,0e-17	01
RNA-directed DNA polymerase	+	-	6,5e-14	01
Ictacalcin	+	-	4,9e-11	01
Protein cpg-2	+	-	1,5e-10	01
Dihydrodipicolinate synthetase	+	-	6,0e-07	01
ATPase subunit 6	+	-	1,2e-07	01
Acidic mammalian chitinase	+	-	9,7e-05	01

*Se refere ao maior match obtido nas bases de dados GO ou KO.

3.6.1. Análise funcional dos clusters de *S. plumieri*

O banco de dados GO objetiva organizar a representação dos genes de acordo com seus atributos. Para isso, define atributos em função de três hierarquias: Processo Biológico, Componente Celular e Função Molecular. Para associar os clusters a estes atributos foram realizados alinhamentos contra as sequências anotadas no BLAST2GO, utilizando a ferramenta BLASTx base de dados não-redundante utilizando limite de exclusão E-value $\leq 10^{-07}$.

Os clusters que apresentaram similaridades com proteínas conhecidas quando combinados com os dados do BLAST2GO utilizando o BLASTx geraram o gráfico que é mostrado na figura 24. A figura representa a proporção dos clusters agrupados nas categorias atribuídas pelo GO. Os resultados mostram que os 143 clusters descritos no banco de dados foram agrupados em 177 identificadores hierarquizados em diferentes funções. Destes, 66 identificadores (37,3%) são classificados na categoria de Processo Biológico, 56 identificadores (31,6%) em Componente Celular e 55 identificadores (31,1%) na categoria Função Molecular. Na análise foi observado que um mesmo cluster pode ser hierarquizado em mais de um identificador, o que justifica o maior número de identificadores em relação aos clusters.

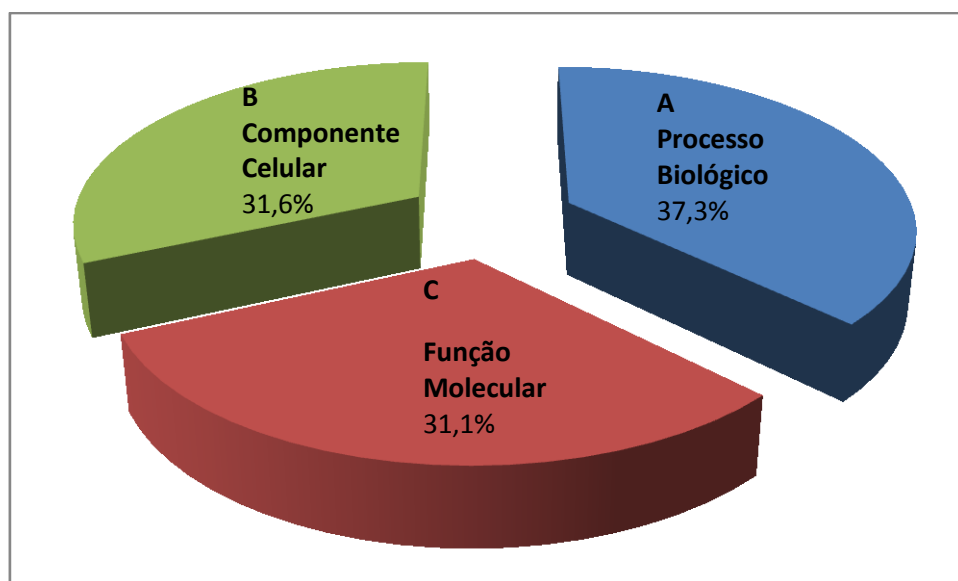


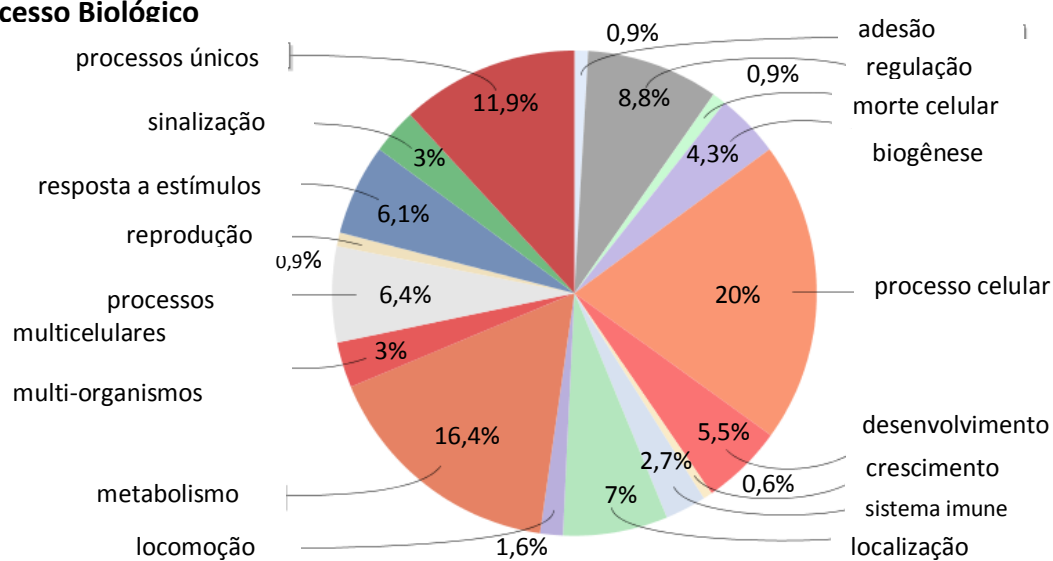
Figura 24: Distribuição dos clusters aplicando os atributos da ferramenta GO utilizando as três hierarquias (BLAST2GO). (A): Domínio Processo Biológico, (B) Domínio Componente Celular e (C): domínio Função Molecular.

Em relação aos Processos Biológicos, os clusters foram distribuídos em diferentes processos celulares (Figura 25A). A tabela 16 mostra que as categorias mais frequentemente representadas são relacionadas aos processos celulares (20%), que inclui em: morfogênese, motilidade, sinalização célula-célula e organização do citoesqueleto. O segundo grupo (16,4%) é formado por processos relacionados ao metabolismo, como a organização das mitocôndrias e genes relacionados a geração de energia mediante reações biossintéticas. O terceiro grupo (11,9%) nomeado de processos únicos é formado por clusters relacionados ao desenvolvimento tecidual, tradução de proteínas e transporte de componentes através de vesículas, que neste caso, provavelmente contribuem para os mecanismos de secreção de toxinas pelas glândulas peçonhentas de *S. plumieri*. Os demais grupos perfizeram menos que 10% e foram distribuídos pelo Gene Ontology em diferentes processos biológicos, como mostrado na tabela 16.

Tabela 16: Anotação funcional com a ferramenta GO dos transcritos classificados como “Processos Biológicos” obtidos no BLAST2GO.

ID	Processos Biológicos (GO)	Número de Transcritos
GO: 0009987	processos celulares	66 (20%)
GO:0008152	processos metabólicos	54 (16,4%)
GO:0044699	processos únicos	39 (11,9%)
GO:0065007	regulação	29 (8,8%)
GO:0051179	localização	23 (7%)
GO:0032501	multicelulares	21 (6,4%)
GO:0050896	resposta a estímulos	20 (6,1%)
GO:0032502	desenvolvimento	18 (5,5%)
GO:0071840	biogênese	14 (4,3%)
GO:0023052	sinalização	10 (3%)
GO:0051704	multi-organismos	10 (3%)
GO:0002376	sistema imune	9 (2,7%)
GO:0040011	locomoção	5 (1,6%)
GO:0007155	adesão	3 (0,9%)
GO:0000003	reprodução	3 (0,9%)
GO:0008219	morte celular	3 (0,9%)
GO:0040007	crescimento	2 (0,6%)

Processo Biológico



A

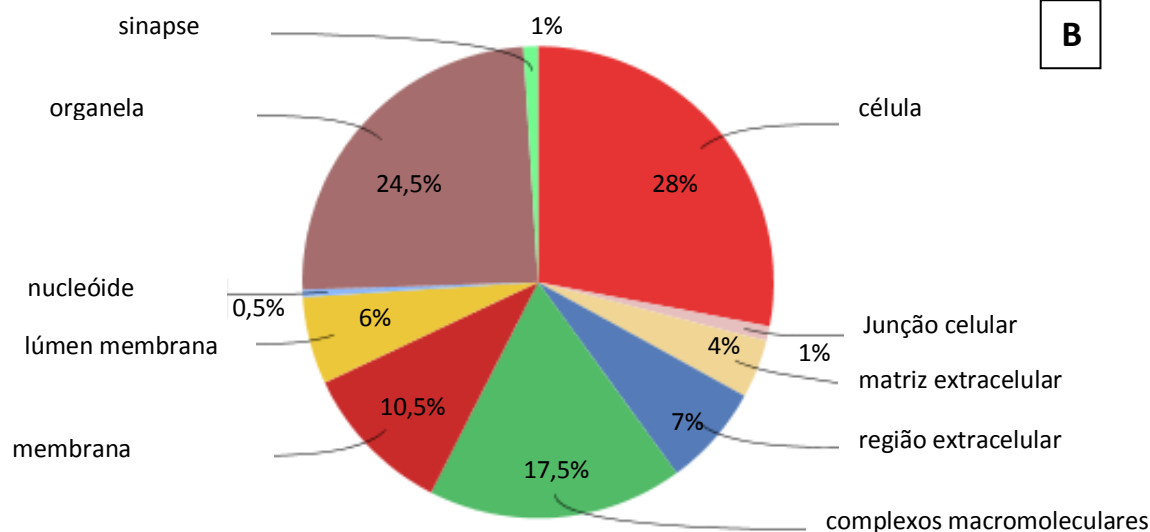
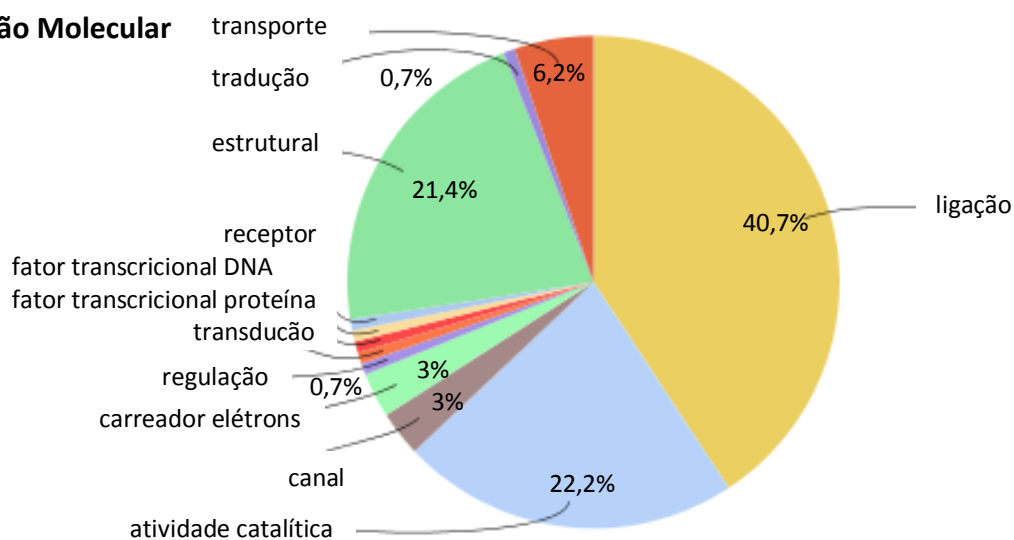
Componente Celular**Função Molecular**

Figura 25: Representação gráfica das três hierarquias (BLAST2GO). Dados obtidos com os identificadores pelo GO (Gene ontology, BLAST2GO) para a construção de figuras com as hierarquias presentes nas análises realizadas com os gráficos combinados. **(A): Processo Biológico:** com identificadores na regulação, sinalização, metabolismo, biogênese, sistema imune, dentre outros. **(B): Componente Celular:** com identificadores celulares, organelas citoplasmáticas, processos membranosos, complexos macromoleculares e relacionados com a matriz extracelular. **(C): Função Molecular:** identificadores em funções de ligação, atividade catalítica, estrutural, de transporte e relacionados às funções transcripcionais, transducionais e de regulação.

Em seguida, de forma complementar os atributos “Componente Celular” e “Função Molecular” foram agrupados em categorias, como realizado para o “Processo Biológico”. Em relação ao Componente Celular (Figura 25B), 28% dos clusters foram identificados como partes celulares, 26% foram classificados como componentes intracelulares, constituídos de organelas celulares e vesículas e 46% associados a processos relacionados com membranas biológicas. Por sua vez, a figura 25C mostra os grupos relacionados com a Função Molecular, dos quais 40,7% foram identificados como proteínas de ligação, 22,2% relacionados a atividades catalíticas, 21,4% classificados como constituintes estruturais principalmente relacionados às proteínas ribossomais, 6,2% categorizados nas funções de transporte e o restante 10,2% relacionados às funções transcricionais, transducionais e de regulação.

Análises adicionais com o BLAST2GO foram realizadas para determinar possíveis vias metabólicas presentes na biblioteca mediante a identificação de enzimas através do código EC (Enzyme Code) e, em seguida realizando a anotação para gerar mapas de possíveis vias metabólicas utilizando a ferramenta KEGG. Após a importação dos clusters foi possível gerar mapas para alguns identificadores, como mostrado na tabela 17. Trinta e sete genes foram mapeados nas vias metabólicas do KEGG, dos quais 11 identificadores EC são relacionados ao metabolismo energético aeróbico da fosforilação oxidativa e do ciclo do ácido cítrico, 8 identificadores EC são relacionados ao metabolismo de aminoácidos e 6 identificadores relacionados aos metabolismos de nucleotídeos, porfirinas e vitaminas.

Tabela 17: As vias metabólicas representadas na biblioteca de *S. plumieri* utilizando a ferramenta KEGG.

Nome da via KEGG	Clusters
Fosforilação oxidativa e CAC	11
Metabolismo de aminoácidos	8
Metabolismo nucleotídeos e porfirina	6
Metabolismo de vitaminas	6
Via das pentoses	2
Sinalização de células T	1
Biossíntese de peptioglicano	1
Metabolismo ácido araquidônico	1
Transporte de tRNA	1

3.7. Screening da biblioteca de cDNAs pelo método de PCR

Na ausência de informações relativas à sequências de mRNAs que codificam toxinas em *S. plumieri*, foram desenhados primers com base em sequências conservadas das toxinas descritas em outros Scorpaeniformes.

Os primers foram desenhados tendo como referência as subunidades α e β que compõem regiões da toxina também nomeada de fator letal identificada nas glândulas de peçonha dos peixes-pedra *Synanceia*. Estas toxinas são denominadas também de Stonustoxina, SNTX (GHADESSY et al., 1996), Verrucotoxina, VTX (GARNIER et al., 1997) e Neoverrucotoxina, NeoVTX (UEDA et al., 2006). A figura 26 mostra a localização dos primers em relação às estruturas das subunidades α e β e a enumeração de nucleotídeos é referente à SNTX de *Synanceia horrida*.

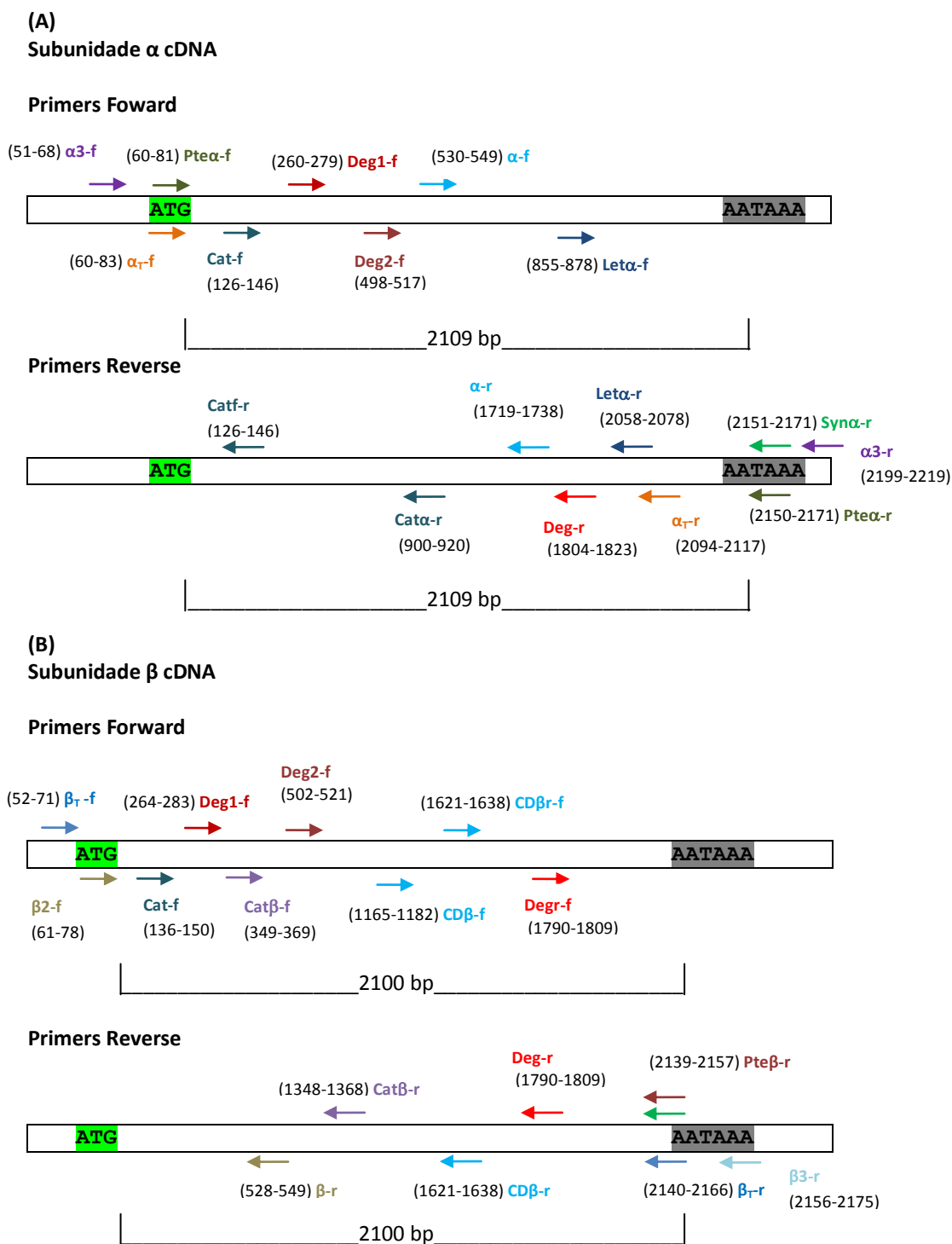


Figura 26: Localização dos primers em relação às subunidades α (A) e β (B) da toxina SNTX de *Synanceia horrida*. Posição de nucleotídeos é referente à SNTX (GHADESSY et al., 1996). As distâncias entre as setas indicam aproximadamente o tamanho do fragmento esperado. Códon de iniciação ATG (verde) e término AATAAA (cinza). Acesso GenBank: U36237.1 (subunidade α) e U32516.1 (subunidade β).

Na tentativa de identificar estas toxinas, várias combinações de primers foram utilizadas em reações de RT-PCRs na presença de uma fração de fagemídeos como molde. As designações e as sequências dos primers forward e reverse usados nos experimentos estão sumarizados na tabela 4, seção Métodos 2.8.1.

Utilizando estes primers foram identificados amplicons mostrados na figura 27. Os fragmentos obtidos foram purificados em colunas GFX e preparados diretamente para o sequenciamento.

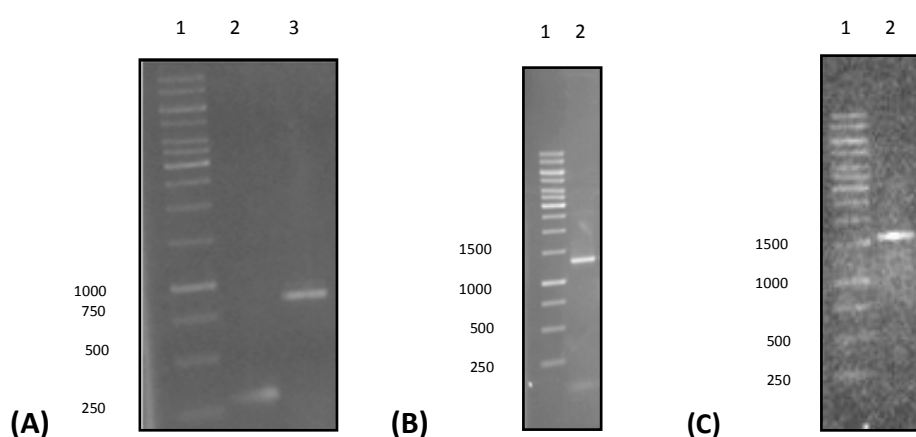


Figura 27: Géis de agarose 1% de fragmentos obtidos por PCR com DNA fagemidial (biblioteca) e combinações de primers putativos para toxinas. (A): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- β -actin; 3- β -f e β -r. (B): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- α -f e β -r. (C): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- β -f e CD β -r*. * Fragmentos clonados em pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning®.

Após o sequenciamento dos produtos de amplificação, as sequências foram editadas e analisadas com o auxílio do banco de dados BLASTn e os alinhamentos obtidos são apresentados na tabela 18.

Tabela 18: Alinhamentos significantes dos fragmentos obtidos por PCR com diferentes combinações de primers e DNA fagemidial, utilizando o banco de dados BLASTn e coleção de nucleotídeos não-reduntantes (nr/nt).

Primers	Fragmento ^{a,b}	Descrição	% cobertura	% identidade	E-value
α -f e β -r	1.134 bp	<i>Oreochromis niloticus</i> , titina (TTN), mRNA	70%	77%	9e ⁻¹⁵⁶
β -f e β -r	852 bp	<i>Branchiostoma floridae</i> , proteína hipotética, mRNA	14%	77%	0.009
β -actina	264 bp	<i>Sebastes schlegelii</i> , β -actina, mRNA	95%	96%	2e ⁻¹¹¹
β -f e CD β -r	1.551 bp	<i>Pterois lunulata</i> , PITx- β , mRNA	99%	81%	0.0

^aSequência de nucleotídeos analisada representa o consenso de dois sequenciamentos de cada fragmento.

^bTamanho do fragmento é referente ao tamanho da região sequenciada.

Inicialmente, para confirmar a representatividade da biblioteca, foram utilizados primers para verificar a presença da actina, um gene conservado durante a evolução. Foi assim que se obteve um fragmento de aproximadamente 200 bp (Figura 27A, canaleta 2) o qual foi sequenciado. O alinhamento da sequência consenso revelou identidade de 96% com β -actina do peixe Scorpaeniforme *Sebastes schlegelii* (Tabela 18, β -actina).

O screening da biblioteca com os primers para as toxinas pode ser resumido como segue: com o uso do par de primers β -f e β -r (Figura 27A, canaleta 3) foi obtida uma sequência hipotética cuja função desconhecida mostrou cobertura de 14% com a sequência do anfioxo *Branchiostoma floridae* (Tabela 18, β -f e β -r), com o par de primers α -f e β -r (Figura 27B, canaleta 2) foi obtido um fragmento titina-like (77% de identidade) descrito no peixe Perciforme *Oreochromis niloticus* (Tabela 18, α -f e β -r). Esses fragmentos também foram encontrados em PCRs com os cDNAs de glândula, como será abordado mais adiante no decorrer desse trabalho.

Outro produto de amplificação obtido com os primers β -f e CD β -r (Figura 27C, canaleta 2) é um fragmento de 1.551 bp que, posteriormente foi subclonado em pCR®8/GW/TOPO® TA. A subclonagem seguida de sequenciamento produziu uma ORF de 1.545 bp que codifica para uma região com 515 aminoácidos e que mostrou 81% de identidade com a subunidade β da toxina de *Pterois lunulata* (Tabela 18, β -f e CD β -r). Este fragmento corresponde à região 1 a 501 da sequência deduzida para a subunidade β de *Pterois lunulata*. A sequência obtida equivale a 74% da toxina em *Pterois lunulata*.

3.7.1. Expressão de um fragmento de SpTx- β como proteínas de fusão

Como primeiro passo para estabelecer as propriedades bioquímicas de SpTx encontrada no peixe-escorpião, foram realizados experimentos de expressão em *E. coli* na tentativa de produzir proteínas recombinantes. Nossas observações de que SpTx não possui modificações pós-traducionais associadas com o retículo endoplasmático e aparato de Golgi reforçam a viabilidade de expressão em sistema bacteriano.

Baseando nisso, nós decidimos incluir um códon de término no fragmento obtido para SpTx- β e, então o cDNA putativo de 1.551 bp (ORF de 517 resíduos) relativo à porção N-terminal da toxina e correspondendo a ~ 74% da proteína madura total foi extraído diretamente da biblioteca de cDNAs e subclonado utilizando a tecnologia Gateway® e sistema de expressão em *E. coli* (Invitrogen™, Life Technologies).

Uma vez criado o clone de entrada, ele foi recombinado com um vetor de destino Gateway® pDEST™17 e, posteriormente transformado em *E. coli* DH5 α . Os clones de expressão foram selecionados, o DNA plasmidial dos clones foram purificados e transformados em células de expressão BL21-AI™, na presença de L(+)-arabinose como indutor da expressão.

Os lisados bacterianos de 0,5 L de cultura foram preparados por sonicação e tratamento com lisozima, como descrito na seção 2.8.3.: “Expressão em sistema *E. coli* com tecnologia Gateway”. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo a porção solúvel foi analisado por SDS-PAGE e o gel corado com Coomassie Blue (Figura 28). O gel mostra o perfil eletroforético dos lisados bacterianos antes e após a indução com L(+)-arabinose. Como observado, uma proteína próxima de 45 kDa foi expressa após indução durante 4 h (canaleta 4). Interessantemente, quando a indução ocorreu durante 12 h foi observado um menor nível de expressão (canaleta 5).

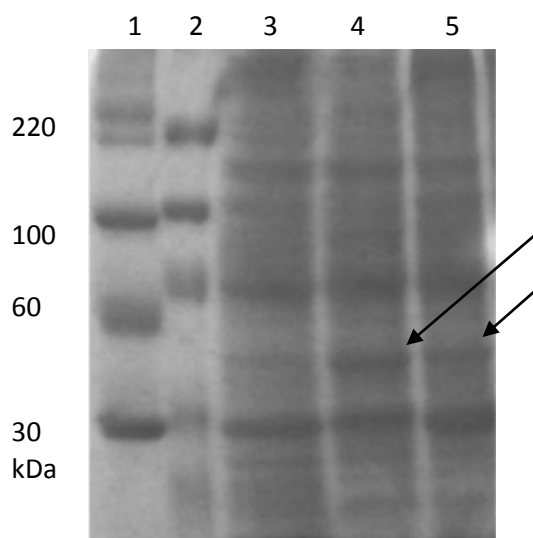


Figura 28: Eletroforese SDS-PAGE 12% dos lisados bacterianos (porção solúvel) da expressão de um fragmento da subunidade β (SpTx- β). As proteínas foram expressas por indução com L(+)-arabinose. da fração da peçonha total de *S. plumieri*. **(1):** Marcador de peso molecular reduzido; **(2):** Marcador de peso molecular não-reduzido; **(3):** Fração não-induzida; **(4):** Fração induzida com L(+)-arabinose durante 4 h; **(5):** Fração induzida com L(+)-arabinose durante 12 h. A seta indica a posição da proteína recombinante expressa.

3.8. Screening das toxinas de *S. plumieri* por RT-PCR

Paralelamente à caracterização da biblioteca, foram realizados ensaios aleatórios para a identificação de possíveis toxinas descritas em outros representantes de Scorpaeniformes. Para isso, 500 ng de mRNA ou 5 μ g de RNA total foram transcritos em cDNA com o First-strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare Life Sciences) e o cDNA resultante utilizado em reações de amplificação através de PCR com primers específicos, como descritos na seção anterior.

Para a produção de fragmentos relacionados com as subunidades α e β , foram realizadas PCRs sob várias condições e com diferentes combinações de primers. Entretanto, as combinações dos primers Let α , α_T , α_3 e Pte α desenhados para amplificar a subunidade α e as combinações dos primers Cat β , β_2 , β_3 e Pte β desenhados para amplificar a subunidade β (Tabela 4), geraram amplicons

inespecíficos de baixa qualidade ou não produziram produto de amplificação, mesmo após ensaios sob diferentes condições de PCR.

Entretanto, com outras combinações de primers foram produzidos fragmentos, os quais foram recuperados após purificação em gel de agarose, reamplificados e sequenciados com sucesso (Figura 29).

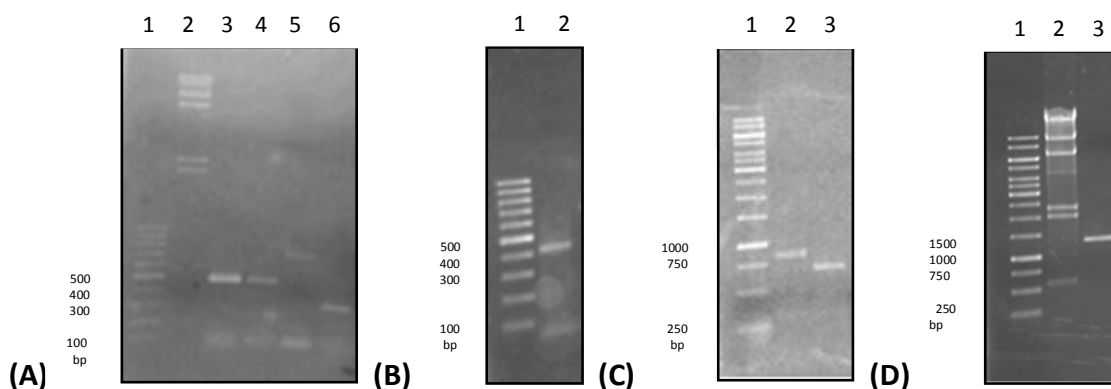


Figura 29: Géis de agarose 1% dos produtos de amplificação utilizando cDNA de *S. plumieri*. (A): 1- 100 bp DNA Ladder; 2- λ -Hind III; 3- α -f e α -r; 4- β -f e β -r; 5- α -f e α -r^{*}; 6- sp-lec-f e sp-lec-r. (B): 1- 100 bp DNA Ladder; 2- β -f e β -r. (C): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- β -f e β -r^{*}; 3- β -f e β -r. (D): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- λ -Hind III; 3- α -f e β -r^{*}.

^{*} Fragmentos clonados em pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®].

Os produtos de amplificação, quando necessário, foram clonados com o kit pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Invitrogen (Life Technologies, Inc.) e os DNAs plasmidiais isolados e sequenciados. A tabela 19 mostra os melhores alinhamentos das sequências geradas com o uso da ferramenta BLASTn não-redundante após edição. Os insertos analisados alinharam com regiões codificantes de genes já descritos em outros peixes.

Tabela 19: Alinhamentos significantes dos fragmentos obtidos com diferentes combinações de primers e cDNA^a de *S. plumieri*, utilizando o banco de dados BLASTn e coleção de nucleotídeos não-reduntantes (nr/nt).

Primers	Fragmento ^b	Descrição	% cobertura	% identidade	E-value
α-f e α-r	509 bp	<i>Neolamprologus brichardi</i> , fosfoproteína-like, mRNA	86%	80%	1 e ⁻¹⁰⁷
α-f e α-r	620 bp	<i>Siniperca chuatsi</i> IRF1 mRNA, completo cds	89%	83%	5 e ⁻¹⁶²
β _T -f e β _T -r	472 bp	<i>Siniperca chuatsi</i> , ubiquitina, mRNA, parcial cds	96%	91%	8 e ⁻¹⁷²
β _T -f e β _T -r	421 bp	<i>Oplegnathus fasciatus</i> , GAPDH1, mRNA, completo cds	91%	74%	5 e ⁻⁷²
β-f e β-r	897 bp	<i>Dicentrarchus labrax</i> , sequência cromossômica	5%	87%	5 e ⁻⁰⁶
β-f e β-r	680 bp	<i>Anoplopoma fimbria</i> , histona H3.3, mRNA, completo cds	17%	94%	9 e ⁻⁴⁴
α-f e β-r	1094 bp	<i>Maylandia zebra</i> , titina-like (TTN), predito, mRNA	96%	86%	0.0
Sp-lec	259 bp	<i>Chelonodon patoca</i> , DNA mitocondrial, genoma completo	75%	84%	7 e ⁻⁴⁵
β-actina	300 bp	<i>Takifugu rubripes</i> , gene β-actina 1, completo cds	98%	91%	3 e ⁻¹⁰⁹

^aSequência de nucleotídeos analisada representa o consenso de três sequenciamentos.

^bTamanho do fragmento é referente ao tamanho consenso da região sequenciada.

Durante a amplificação com os primers α-f e α-r, foi inicialmente obtido um fragmento de 500 bp (Figura 29A, canaleta 3). O resultado do sequenciamento gerou um consenso de 509 bp que alinhou com sequências de fosfoproteínas-like já caracterizadas em outros peixes (Tabela 19, α-f e α-r, 509 bp). A região traduzida *in silico* produziu uma ORF de 93 resíduos que corresponde à região C-terminal de fosfoproteínas de 28 kDa (PP28) estável ao calor e acidez, identificadas em peixes (Figura 30).

```

Scorpaena plumieri      ---SRWEDTTRVSQKNRKVSDVHLSAPRELSRREREIEKQKSKERYMKLHLEGK
Danio rerio             ---IEIENPNRVSQSKKVVEIDVNAPELSRREREIEKQKAKERYMKLHLEGK 117
Salmo salar             ---IEIENPNRISQSKKVTELDVNAPELSRREREIEKQKAKERYMKLHLEGK 120
Neolamprologus brichardi ---IEIENPNRVAQSKKVAEVDVSAPRELSRREREIEKQKSKERYMKLHLEGK 119
                        *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:
Scorpaena plumieri      TEQARADLARLAIKKQREDAAKKRDERKKAEEEEAAKAKR
Danio rerio             TEQARADLARLAIKKQREDAAKKREELRKEKEAEAKSKR 158
Salmo salar             TDQARADLARLAIKKQREDAQKKRDGLKKEKEAEEDSKSKR 161
Neolamprologus brichardi TEQARADLARLAIKKQREDAAKKRDELRLKEKEVEEAKAKR 160
                        *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:

```

Figura 30: Alinhamento do cDNA de *S. plumieri* com fosfoproteína-like PP28 utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2. As posições de aminoácidos são referentes a outras fosfoproteínas-like caracterizadas em peixes. *identifica resíduos idênticos; : identifica um resíduo conservado. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank nucleotide sequence databases): transportador de ácido monocarboxílico de *Danio rerio*, NP997797.1; fosfoproteína 28 kDa estável ao calor e acidez de *Salmo salar*, ACI33398.1; fosfoproteína-like 28 kDa estável ao calor e acidez de *Neolamprologus brichardi*, XP006807365.1.

Posteriormente, alterando as condições de anelamento para a mesma PCR, foi obtido um fragmento de 700 bp que foi clonado em pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® (Figura 29A, canaleta 5). Após sequenciamento do DNA gerou-se uma sequência consenso de 620 bp. O alinhamento usando o banco de dados BLASTn, revelou uma forte similaridade com a região transcricional de IRF-1 – Fator Regulatório de Interferon ($E\text{-value} = 5 \times 10^{-162}$, 83% de identidade) já identificado em outros peixes (Tabela 19, $\alpha\text{-f}$ e $\alpha\text{-r}$, 620 bp). A região traduzida *in silico* contém uma ORF de 167 resíduos correspondente aos resíduos 130-300 da região C-terminal de IRF-1 de *Siniperca chuatsi* (Figura 31).

<i>Scorpaena plumieri</i>	-----QNYPGIKLEEDDCSNTQPPASESKQEN---TQENTVDSTGYTEQQDFFP	
<i>Siniperca chuatsi</i>	RSKAKETKPRKKSSMIKMEEDMDYSDTQSPMDGSMPEDTLSTQENTVDSTVHTEHQDFFP	180
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	RSKAKETKPRKKSTMVKTEEDMDYSDTQSPMDGSMPEDTLSTQENTVDSTVHTEHQDFFP	180
<i>Miichthys miiuy</i>	RSKAKEAKLRKKTSIVKMEEDTDYSDTQSPINDSTQEDTMSQENTVDSTVNAEKEDFSF	180
<i>Sparus aurata</i>	RTKAKQTKTMKSAIVKMEEE---DSDTPMDESINVEDTSSAQENTVDSTVNTTEEDFSF	176
<i>Epinephelus coioides</i>	RSKAKEAKTRKKSSMIKVEEDADCSEAQSPMDESMPEDTFSTQENTVDSTVHTEHQDFFP	180
	:: : * ** : :: : * * * : : ***** : * : **	
<i>Scorpaena plumieri</i>	VPPSEVPDWALSIEIGPGNFQ--NNFCORFEVSPHEGPDYDITDDIIKICQQLERDSNWMP	
<i>Siniperca chuatsi</i>	VAPSDVPDWLSLVEIGAESLL--NNICHRFEVSPHEGPDYDITDDIIKICQQLERDSNWMS	239
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	VAPSDVPDWSSSVEI--ESFQ--SNFHRFEVSPERSDDYDITDDIIKICQQLERDSNWMT	237
<i>Miichthys miiuy</i>	VAPSEVPDWLSLVEIGPEALP--YTFNHRFEVSPHEGPDYDITDDIIKICQQLERDSNWMP	239
<i>Sparus aurata</i>	VAPSEVPDWMSVEIGGSPFPNQTFCRFEVSPHEGPDYDITDDIIKICQQLERDSNWMT	236
<i>Epinephelus coioides</i>	VSTSEVPDWLSLVEIGPESFP--TNFCRFEVSPHEGPDYDITDDIIKICQQLERDSNWMS	239
	* : ***** : * : ***** : * : ***** : * : ***** : * : *****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	--SSLDCKGFLSNEACTSPGSQWIV--SSSVDELDEVPQYTTLGSDFLNPTDDLWNSFCQQM	
<i>Siniperca chuatsi</i>	--SSLDGRGFLSNEACTSPGSQWSE--SSSVDELDDLPHYTTLGSDDLTPDDLWNSFCQQM	297
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	--SSLDGNGFLSNEACTSPGSQWSE--SSSVDELDMPQYTTLGSDLTNPTDDLWNSFCQQI	294
<i>Miichthys miiuy</i>	--STLDGRGFLSNEACTSPRSQWSE--SSSGDDLDDFPRTYTLGSDT---NFSLWNSLCHQI	294
<i>Sparus aurata</i>	TCSLDGTGFLSNEACTSPGSQWSE--SSSVDELDDIPQYITLGADPP--TDDFWSGFCQQL	293
<i>Epinephelus coioides</i>	--SSLDGKGFLSNEACTSPGSQWSESASSVEELDDVPEYITLGTGITNPTDDLWNSFCQHM	298
	: ** ***** * * : ** : : : * * * : : * : : : *	
<i>Scorpaena plumieri</i>	PLL-----	
<i>Siniperca chuatsi</i>	PPM-----	300
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	PPC-----	297
<i>Miichthys miiuy</i>	DSL-----	297
<i>Sparus aurata</i>	PHF-----	296
<i>Epinephelus coioides</i>	PLL-----	301

Figura 31: Alinhamento do cDNA de *S. plumieri* com IRF-1 utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2. As posições de aminoácidos são referentes a outras IRFs caracterizadas em peixes. *identifica resíduos idênticos; : identifica um resíduo conservado. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank nucleotide sequence databases): IRF-1 de *Siniperca chuatsi*, AAV65042.1; IRF-1 de *Oplegnathus fasciatus*, ADJ21809.1; IRF-1 de *Miichthys miiuy*, AHB59735.1; IRF-1 de *Sparus aurata*, AAY68281.1; IRF-1 de *Epinephelus coioides*, ACF95885.1.

Com o par de primers $\beta\text{-f}$ e $\beta\text{-r}$ e PCR de alta estrringência foi obtido um fragmento de 500 bp (Figura 29A, canaleta 4). Análise da sequência consenso após

edição mostrou um forte alinhamento com ubiquitinas de peixes (Tabela 19, β_T -f e β_T -r, 472 bp). A região traduzida *in silico* produziu uma ORF de 156 resíduos putativos (resultados não mostrados), os quais 146 alinharam fortemente com ubiquitina-40 S proteína ribossomal S27a de *Danio rerio* (E-value = 1×10^{-85} , 99% identidade).

Com o mesma combinação de primers e com menor estridência também foi obtido um fragmento de 400 bp (Figura 29B, canaleta 2). Após a edição, a sequência consenso revelou com auxílio do banco de dados BLASTn um alinhamento com a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de peixe (Tabela 19, β_T -f e β_T -r, fragmento 421 bp). Neste caso, ORFs não foram identificadas.

Para o par de primers β -f e β -r foram realizadas várias PCRs sob diferentes condições que resultaram em duas bandas aproximadas de 800 bp e 600 bp, as quais foram isoladas do gel e reamplificadas separadamente por PCR (Figura 29C, canaleta 2 e 3, respectivamente).

As análises da sequência consenso do fragmento de 800 bp após a clonagem em pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® revelaram uma baixa similaridade com sequências depositadas em banco de dados utilizando a ferramenta BLASTn (Tabela 19, β -f e β -r, 873 bp) e uma ORF de 171 resíduos também foi detectada para uma proteína hipotética do organismo marinho, cnidário *Nematostella vectensis* (E-value = 6×10^{-23} , 30% identidade). Além disso, nesta análise foi detectado no banco de dados BLASTn um multi-domínio conservado, o identificador FimD (E-value = 2.90×10^{-04}), que corresponde a um domínio de porinas envolvidos na motilidade, secreção e tráfico intracelular. Entretanto, a sequência consenso analisada na sua totalidade foi considerada como desconhecida (resultados não mostrados).

Para o segundo fragmento (600 bp), após edição gerou uma sequência consenso de 680 bp que após busca no banco de dados BLASTn, revelou um forte alinhamento com histonas de peixes com E-value de 9×10^{-44} (Tabela 19, β -f e β -r, 680 bp). Entretanto, ORFs putativas não foram identificadas nestas análises (resultados não mostrados).

Por não ter encontrado produtos relacionados à toxinas esperadas com os primers até agora relatados, optamos por realizar PCRs combinando os primers α e β , já que as subunidades α e β apresentam algum grau de homologia. Utilizando a combinação de primers (α -f e β -r) foi obtido um fragmento de aproximadamente 1.100

bp (Figura 29D, canaleta 3). Para a análise deste fragmento, foi necessário a realização da clonagem em pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning®.

A clonagem produziu recombinantes, que após isolamento foram sequenciados e editados. A sequência consenso mostrou alta similaridade com genes que codificam para proteínas titinas-like de peixes (Tabela 19, α -f e β -r, 1.094 bp). Nesta sequência foi identificada uma ORF de 1.092 bp putativa para 364 aminoácidos a qual apresentou um alinhamento significativo (E-value = 2×10^{-163} , 75% de identidade) com titina predita do peixe *Maylandia zebra* (Figura 32).

<i>Scorpaena plumieri</i>	---KVEDTNQGGSTCATISLDVEIPAKINLPKNLKDKEAIPALRGEVNNIKI	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	---QIRATNQGGSTCATVSLDVEIPAKINLPKNLKDKEAIPALRGEVNNIKI	25161
<i>Pundamilia nyererei</i>	---QIRATNQGGSTCATVSLDVEIPAKINLPKNLKDKEAIPALRGEVNNIKI	24235
<i>Maylandia zebra</i>	---QIRATNQGGSTCATVSLDVEIPAKINLPKNLKDKEAIPALRGEVNNIKI	29779
<i>Oreochromis niloticus</i>	---QIRATNQGGSTCATVSLDVEIPAKINLPKNLKDKEAIPALRGEVNNIKI	26238
	: : *****.*****:*****:*****:*****:*****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	PFSGKPDVPVITWQKGQDLIDSNHGYQVIVTRSFSTSLVFTNGVEKKDAGFYIV	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	PFSGKPDVPVITWQKGQDLIDSNHGYQVIVTRSFSTSLVFPNGVEKKDAGFYIV	25213
<i>Pundamilia nyererei</i>	PFSGKPDVPVITWQKGQDLIDSNHGYQVIVTRSFSTSLVFPNGVEKKDAGFYIV	24287
<i>Maylandia zebra</i>	PFSGKPDVPVITWQKGQDLIDSNHGYQVIVTRSFSTSLVFPNGVEKKDAGFYIV	29831
<i>Oreochromis niloticus</i>	PFSGKPDVPVITWQKGQDLIDSNHGYQVIVTRSFSTSLVFPNGVEKKDAGFYIV	26290
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	CAKNRFGIDQQTVELDVAVSDPPRGVKASDVSRDSVTLNWVAPANDGGSRV	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	CAKNRFGIDQQTVELDVADVDPDPGRGVKASDVSRDSVTLNWVAPANDGGSKV	25265
<i>Pundamilia nyererei</i>	CAKNRFGIDQQTVELDVADVDPDPGRGVKASDVSRDSVTLNWVAPANDGGSKV	24339
<i>Maylandia zebra</i>	CAKNRFGIDQQTVELDVADVDPDPGRGVKASDVSRDSVTLNWVAPANDGGSKV	29883
<i>Oreochromis niloticus</i>	CAKNRFGIDQQTVELDVADVDPDPGRGVKASDVSRDSVTLNWVAPANDGGSKV	26342
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	ISYIIEKCPPTAERWQVQSRDTHYTVTNLFGGTSYQFRIIAENKFGQSAP	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	ISYIIEKCPPTAERWQVQSRDTHYTVTNLFGGTSYQFRIIAENKFGQSAP	25317
<i>Pundamilia nyererei</i>	ISYIIEKCPPTAERWQVQSRDTHYTVTNLFGGTSYQFRIIAENKFGQSAP	24391
<i>Maylandia zebra</i>	ISYIIEKCPPTAERWQVQSRDTHYTVTNLFGGTSYQFRIIAENKFGQSAP	29935
<i>Oreochromis niloticus</i>	ISYIIEKCPPTAERWQVQSRDTHYTVTNLFGGTSYQFRIIAENKFGQSAP	26394
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	SETSGPVMTKEDKSRVLLYDREVDDTGYVPRSKAPHSDAKNLHNKFAIAEEL	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	SETSGPVMTKEDKSRVLLYDREVDDTGYVPRSKAPHSDAKNLHNKFAIAEEL	25369
<i>Pundamilia nyererei</i>	SETSGPVMTKEDKSRVLLYDREVDDTGYVPRSKAPHSDAKNLHNKFAIAEEL	24443
<i>Maylandia zebra</i>	SETSGPVMTKEDKSRVLLYDREVDDTGYVPRSKAPHSDAKNLHNKFAIAEEL	29987
<i>Oreochromis niloticus</i>	SETSGPVMTKEDKSRVLLYDREVDDTGYVPRSKAPHSDAKNLHNKFAIAEEL	26446
	:*:***:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	GQRTVWHCPCLYISSEKTYMAKFFKVRGADQAIKKEFATLNGGQTCQLLL	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	GRGQFGIVHRCVEISSEKTYMAKFFKVRGADQTLVKKEIATLNLARHANYLL	25421
<i>Pundamilia nyererei</i>	GRGQFGIVHRCVEISSEKTYMAKFFKVRGADQTLVKKEIATLNLARHANYLL	24495
<i>Maylandia zebra</i>	GRGQFGIVHRCVEISSEKTYMAKFFKVRGADQTLVKKEIATLNLARHANYLL	30039
<i>Oreochromis niloticus</i>	GRGQFGIVHRCVEISSEKTYMAKFFKVRGADQTLVKKEIATLNLARHANYLL	26498
	*:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
<i>Scorpaena plumieri</i>	LMESVRQPWKSGSSFYGLIQALDIFERLKPAEVGAYDVELGNLTSGKVCVS	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	LHESFDSPEE-LVMIYDFISGVDIFERLSIAEFELNEREIVNYIR-QVCSA	25471
<i>Pundamilia nyererei</i>	LHESFDSPEE-LVMIYDFISGVDIFERLSIAEFELNEREIVNYIR-QVCSA	24545
<i>Maylandia zebra</i>	LHESFDSPEE-LVMIYDFISGVDIFERLSIAEFELNEREIVNYIR-QVCSA	30089
<i>Oreochromis niloticus</i>	LHESFDSPEE-LVMIYDFISGVDIFERLSIAEFELNEREIVNYIR-QVCSA	26548
	* * * : : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>Scorpaena plumieri</i>	HLWGS-----	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	LEFLH-----	25476
<i>Pundamilia nyererei</i>	LEFLH-----	24550
<i>Maylandia zebra</i>	LEFLH-----	30094
<i>Oreochromis niloticus</i>	LEFLH-----	26553
	:	

Figura 32: Alinhamento do cDNA de *S. plumieri* com domínio de titina imunoglobulina (Ig)-like utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2. As posições de aminoácidos são referentes a outras titinas caracterizadas em peixes. *identifica resíduos idênticos; : identifica um resíduo conservado. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank nucleotide sequence databases): Titin-like de *Neolamprologus brichardi*, XP006799230.1; Titin-like de *Pundamilia nyererei*, XP005750383.1; Titin-like de *Maylandia zebra*, XP004574480.1; Titin de *Oreochromis niloticus*, XP005463429.1.

Com a intenção de identificar o transcrito responsável para uma lectina já descrita no aparato peçonhento de *S. plumieri*, um par de primers degenerados foi desenhado baseado na sequência N-terminal da lectina. A figura 29A, canaleta 6 um fragmento de 300 bp obtido com o uso do par de primers Sp-lec que que alinhou com DNA mitocondrial (Tabela 19, Sp-Lec, 259 bp). A região traduzida *in silico* produziu uma ORF de 255 nucleotídeos e 75 resíduos aminoácídicos alinharam com regiões putativas da subunidade 1 da enzima NADH desidrogenase caracterizadas em outros peixes.

3.8.1. Identificação, construção quimérica e propriedades de SpTx- α de *S. plumieri*

Em função dos resultados obtidos para o isolamento das hipotéticas subunidades α e β com os primers escolhidos, iniciamos uma nova procura de regiões descritas na literatura para estas toxinas com potencial de serem amplificadas próximas aos domínios responsáveis pela atividade hemolítica (fator letal) presentes nestes peixes.

Para aumentar a chance de amplificação de fragmentos correspondentes às toxinas, foram utilizadas combinações de primers localizados em regiões internas descritas para outras toxinas já identificadas. As regiões escolhidas para o desenho dos primers foram aquelas com prevalência de resíduos catiônicos ou com a presença de resíduos de Cys que são altamente conservados nessas proteínas. Assim, foi necessário o desenho de primers (Tabela 20) que abrangem várias regiões da subunidade α (Figura 26A) que contribuíssem para a descrição da estrutura completa da proteína.

Tabela 20: Relação de primers identificados nas sequências nucleotídicas de SpTx- α e SpTx- β .

Designação do primer	Sequência nucleotídica*	Posição nucleotídica ^a
Subunidade α		
α -f	5' -ATGTCTTCAGATTTGGTAATGCCT-3'	78-98
Cata-f	5' -CGCAGAGAGAACTGATCCCA-3'	144-164
Cataf-r	5' -TGGGATCAGTTTCTCTCTGCG-3'	144-164
Deg1-f	5' -GATGGATATTGAAGCWTCTC-3'	278-297
Deg2-f	5' -GGGGCMAATGCTTTCTTTGT-3'	516-535
α -f	5' -CAAGGTAGAGGATACCAACC-3'	548-567
Cata-r	5' -ATTGGCTCTCCTCTTCAGTTT-3'	918-938
CD β -r	5' -GAGCTCACAGTCATACCA-3'	1.635-1652
Degr-f	5' -ATTACTGGGAGGTGGAGTGG-3'	1.804-1.823
Degr	5' -CCACTCYAMCTCCCAGTAAT-3'	1.804-1.823
Syn α -r	5' -TYAAAGTAATCTGASAGTTCC-3'	2.166-2.186
Subunidade β		
β -f	5' -GTTGGAGTCATGCCTTCAGAC-3'	63-83
β 2-f	5' -ATGCCTTCAGACATCTTG-3'	72-89
Deg1-f	5' -GATGGATATTGAAGCWTCTC-3'	275-294
Cat β -f	5' -AAGAAATTCAAGAATCAGAGT-3'	360-380
Deg2-f	5' -GGGGCMAATGCTTTCTTTGT-3'	513-532
CD β -r	5' -GAGCTCACAGTCATACCA-3'	1.634-1.651
CD β r-f	5' -TGGTATGACTGTGAGCTC-3'	1.634-1.651
Degr	5' -CCACTCYAMCTCCCAGTAAT-3'	1.801-1.820
Degr-f	5' -ATTACTGGGAGGTGGAGTGG-3'	1.801-1.820
β -r	5' -ATTTTACAATAGTTTAATTTGACCATT-3'	2.151-2.168
Syn β -r	5' -TAGTTTAAATTTGACCATT-3'	2.151-2.168

^aRefere-se para SpTx- α e SpTx- β , respectivamente.

*Sequências em negrito se referem aos primers que originaram produtos de amplificação para a reconstrução das subunidades α e β .

Os produtos de PCR (Figura 33) obtidos após amplificação do cDNA de *S. plumieri* foram purificados em coluna GFX e clonados com o kit pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA, Invitrogen (Life Technologies, Inc.) para posterior sequenciamento. Para isso, 10-20 clones obtidos após cada clonagem foram crescidos em meio líquido e os DNAs plasmidiais isolados por lise alcalina, como descrito na seção Métodos: “2.4.10. Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes (Mini-preparações)”.

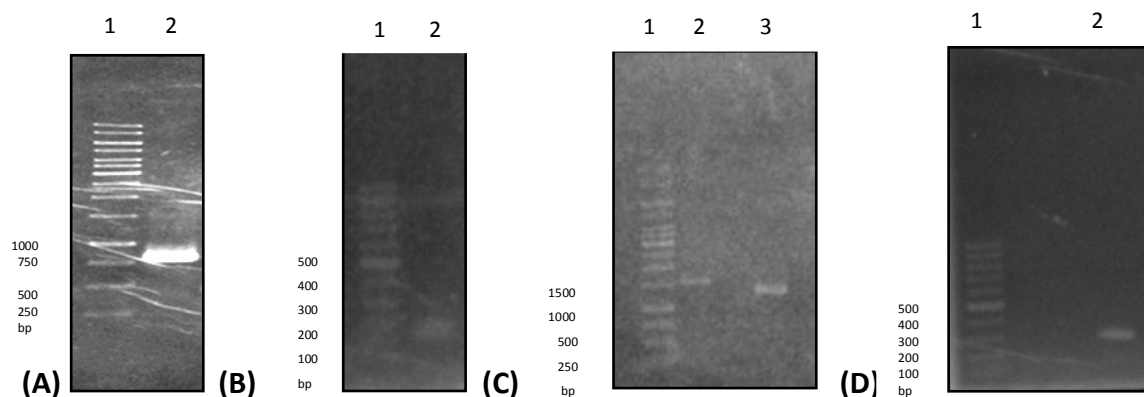


Figura 33: Géis de agarose 1% dos fragmentos de DNA referentes às regiões da subunidade α identificados em *S. plumieri* utilizando diferentes combinações de primers. **(A):** 1- 1 kb DNA Ladder, 2- $\text{Cata}\alpha\text{-f}$ e $\text{Cata}\alpha\text{-r}^*$. **(B):** 1- 100 bp DNA Ladder, 2- $\alpha\text{-f}$ e $\text{Cata}\alpha\text{-r}$. **(C):** 1- 1 kb DNA Ladder, 2- Deg2-f e Deg-r^* , 3- Deg1-f e Deg-r^* . **(D):** 1- 100 bp DNA Ladder, 2- Degr-f e $\text{Syn}\alpha\text{-r}^*$. * Fragmentos clonados em pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning®.

Inicialmente, a amplificação com o par de primers $\text{Cata}\alpha\text{-f}$ e $\text{Cata}\alpha\text{-r}$ produziu um fragmento de 800 bp – $\text{Cata}\alpha$ (Figura 33A) cuja sequência obtida após clonagem foi analisada com o algoritmo BLASTn. A sequência correspondia com uma região da subunidade α e o consenso resultante também revelou um alinhamento significativo com cDNAs de toxinas de outros peixes-escorpião (Tabela 21, $\text{Cata}\alpha\text{-f}$ e $\text{Cata}\alpha\text{-r}$). Com auxílio da ferramenta Translate/Expasy, foi identificada uma ORF de 795 bp que foi traduzida “*in silico*” resultando em 265 resíduos, os quais alinharam com subunidades α das toxinas de Scorpaeniformes relatadas no banco de dados BLAST/UniProt.

A comparação da sequência protéica deduzida para outras proteínas usando o algoritmo BLASTx revelou homologia significativa com identidade entre 60-79% com toxinas das espécies de *Hypodytes*, *Synanceia*, *Inimicus* e *Pterois*. A sequência consenso alinhou nas posições 24-288 com a subunidade α da toxina de *Hypodytes rubripinnis* e neste alinhamento foi detectado um resíduo de Cys conservado nas toxinas descritas, localizado na posição 205 quando comparado com as outras toxinas descritas de Scorpaeniformes.

Tabela 21: Alinhamentos significantes dos fragmentos putativos para toxinas com cDNA de *S. plumieri*, utilizando o banco de dados BLASTn e coleção de nucleotídeos não-reduntantes (nr/nt).

Primers	Fragmento ^{a,b}	Descrição	% cobertura	% identidade	E-value
Subunidade α					
Catα-f e Catα-r	795 bp	<i>Hypodytes rubripinnis</i> , HrTx-α, mRNA	100%	86%	0.0
α _T -f e Catαf-r	164 bp	<i>Hypodytes rubripinnis</i> , HrTx-α, mRNA	53%	90%	4 e ⁻²⁴
Deg2-f e Deg-r (Deg2')	1.367 bp	<i>Pterois volitans</i> , PvTx-α, mRNA	91%	77%	0.0
Degr-f e Synα-r	378 bp	<i>Synanceia verrucosa</i> , NeoVTX-α, mRNA	62%	69%	2 e ⁻⁰⁷
Subunidade β					
CDβ-f e CDβ-r	471 bp	<i>Pterois antennata</i> , PaTx-β, mRNA	100%	85%	1 e ⁻¹⁴³
Deg1-f e Deg-r	1.201 bp	<i>Pterois antennata</i> , PaTx-β, mRNA	84%	86%	0.0
Deg2-f e Deg-r (Deg2)	1.215 bp	<i>Pterois antennata</i> , PaTx-β, mRNA	84%	86%	0.0
β _T -f e CDβ-r	1.551 bp	<i>Pterois lunulata</i> , PITx-β, mRNA	99%	81%	0.0
CDβr-f e Synβ-r	547 bp	<i>Inimicus japonicus</i> , IjTx-β, mRNA	97%	81%	4 e ⁻¹⁴⁴

^aSequência de nucleotídeos analisada representa o consenso de pelo menos três sequenciamentos.

^bTamanho do fragmento é referente ao tamanho da região sequenciada.

O desenho de novos primers localizados em regiões próximas ao fragmento Catα (posição 24-286) foi necessário para a caracterização completa da região codificadora da subunidade α.

Para a caracterização da região putativa N-terminal da toxina α, foi utilizado um primer reverse complemento do primer Catα, o qual combinado com o primer forward α_T-f gerou um produto de amplificação de aproximadamente 200 bp - α_T-f e Catαf-r (Figura 33B). Após clonagem e isolamento do DNA plasmidial, a sequência consenso do inserto totalizou 164 bp e as análises com o uso do BLASTn revelou um alinhamento significativo com cDNAs de toxinas de Scorpaeniformes (Tabela 21, α_T-f e Catαf-r).

Com auxílio da ferramenta Translate/ExPASy, foi identificada uma ORF de 159 bp, que traduzida *in silico* produziu 53 resíduos de aminoácidos, os quais alinharam a partir da posição 25, (primeiro resíduo Met) com a região N-terminal da subunidade α das toxinas de Scorpaeniformes relatadas em banco de dados. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos com outras proteínas usando o algoritmo BLASTx revelou homologia significativa com identidade entre 70-83% com toxinas das espécies de *Hypodytes*, *Synanceia*, *Inimicus* e *Pterois*. A ORF alinhou nas posições 1-29 com subunidade α de SNTX caracterizada em *Synanceia horrida*.

Para obter os fragmentos das regiões internas da subunidade α de *S. plumieri*, vários primers não incluídos nas clonagens prévias foram desenhados, entretanto somente com os primers degenerados Deg1-f, Deg2-f e Deg-r (Tabela 20) foram detectados produtos de amplificação relacionados a subunidade α . Esses primers foram desenhados utilizando como modelo os primers para a caracterização das toxinas de lionfish (*Pterois antennata* e *Pterois volitans*), realizada por Kiriake e Shiomi, 2011.

Os primers degenerados Deg1-f e Deg2-f foram combinados separadamente em reações de PCRs com o primer reverse Deg-r. As posições correspondem a regiões altamente conservadas em toxinas de stonefish. As sequências nucleotídicas destes primers correspondem com as posições 260-279 (Deg1-f), 498-517 (Deg2-f) e 1804-1823 (Deg-r), em relação à SNTX (Figura 26). Utilizando essas combinações de primers, foram obtidos dois produtos de amplificação com aproximadamente 1.300 bp – Deg1 e 1.500 bp – Deg2, respectivamente (Figura 33C). Após clonagem e sequenciamento dos clones obtidos com os pares Deg1-f e Deg-r gerou-se um fragmento correspondente a subunidade β , portanto a descrição será feita na próxima seção.

No caso dos primers Deg2-f e Deg-r (1.500 bp), o fragmento clonado e sequenciado revelou ser uma mistura de dois amplicons nomeados de Deg2 e Deg2', um deles correspondente a uma região da subunidade α e o outro à uma região da subunidade β (Tabela 21, Deg2–subunidade β e Deg2'–subunidade α , Deg2-f e Deg2-r).

O fragmento Deg2 correspondente à subunidade β também será analisado posteriormente. Em relação ao fragmento Deg2' foi obtida uma sequência consenso de 1.367 bp (Tabela 21, Deg2') que produziu uma ORF de 455 resíduos, dos quais 440 alinharam com 71% de identidade com a subunidade α de *Pterois lunulata* (PITx- α), nas posições 148-587. Após o alinhamento, foi verificado que o produto Deg2' se sobrepõe ao Cat α a partir da posição 148 a 286, de acordo com o ilustrado na figura 34A. Seguidamente, as regiões comuns foram alinhadas e foi elaborada uma ORF consenso constituída por 1.818 bp que codifica para 606 aminoácidos, correspondentes desde a posição 1 a 583 com as estruturas primárias das subunidades α descritas em Scorpaeniformes.

Enfim, para caracterizar a região putativa C-terminal da subunidade α , foi utilizado um primer forward complemento do oligo Deg-r e combinado com o primer

Syn α -r para a obtenção de um fragmento de 300 bp – Degr-f e Syn α -r como mostrado na figura 33D. Após clonagem e sequenciamento, a sequência consenso gerada totalizou 378 bp e as análises com o uso do BLASTn, não revelaram um alinhamento significativo com a região C-terminal das subunidades α de toxinas de Scorpaeniformes (Tabela 21, Degr-f e Syn α -r), entretanto, com auxílio da ferramenta Translate/ExPASy, foi identificada uma ORF correspondente a 126 resíduos de aminoácidos, a qual alinhou a partir da posição 583-584 com as subunidades α de Scorpaeniformes. Nesse fragmento foi possível detectar na região final três códons TAA, indicando um possível sinal de término na síntese da proteína.

A inclusão do fragmento C-terminal no alinhamento anterior permitiu a reconstrução completa da subunidade α hipotética encontrada em *S. plumieri* (Figura 34A), que totalizou 2.192 bp. A toxina quimérica descrita nesse trabalho foi nomeada de SpTx- α e os primers encontrados nessa sequência estão mostrados na tabela 20.

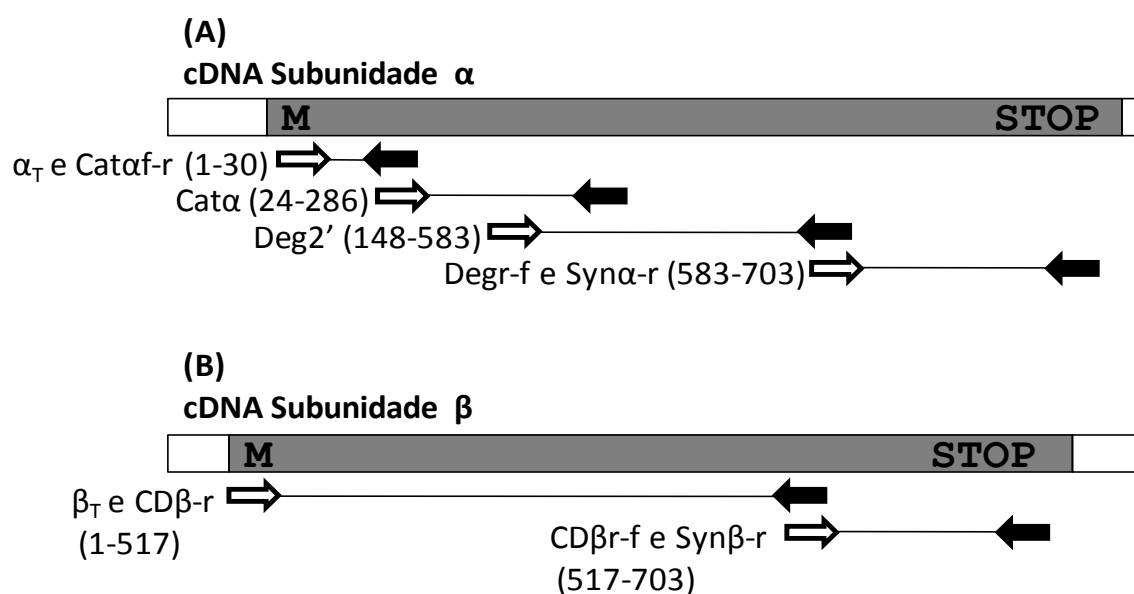


Figura 34: Esquema para a caracterização das subunidades α e β da toxina SpTx. Primers forward e reverse estão indicados por setas brancas e pretas, respectivamente. A sequência dos primers utilizados é apresentada na tabela 22. As posições de aminoácidos são relativas à estrutura primária do cDNA da subunidade α de *Pterois* sp e *Synanceia* sp. As posições relativas das setas indicam o tamanho aproximado do fragmento putativo. Códons de iniciação M e término STOP. **(A):** Sobreposição putativa

dos fragmentos da subunidade α (α_T -f e Cataf-r, Cata α , Deg2'e Syn α -r). **(B):** Sobreposição putativa dos fragmentos da subunidade β (β_T -f e CD β -r, CD β -f e Syn β -r).

A sequência completa para a subunidade α de *S. plumieri* foi elucidada como mostrado na figura 35. Nesta sequência foi detectado na região 5' o códon de iniciação (ATG) na posição 78-80 e, por outro lado, na região 3' o sinal (AATAAA) e a cauda poli (A) não foram identificadas, em vez disso, três códons de término (TAA) foram encontrados entre as posições 2.183-2.192.

A

tataatggagaacaattttttttttttccaattgtgtgcaaaaaagcagggtccgaattgccccctgttccatca	89
atcataatgagcgggtctgggtcgacctttccacctgggtttctgtatgatgcccgcagagagaaactgatcccagggtttctcattg	176
I I M A G L G R P F T L G F L Y D A R R R E K L I P G F S L	
tttggtgatgaaactctgcaaaagtatgcaacaagtaccctcaacacagcagtgatttccaaatcggtgctctgattctgttgaa	263
F G D E T L Q K Y A T S T P Q H S S D F Q I V A S D S V E	
tccaagtctaaactgtagtgatattgaagcttctctgggagtcagtttctctgggtggactggttgaagttgggggatctgccaaatat	350
S K S N V M D I E A S L G V S F L G G L V E V G G S A K Y	
ctcaataatacgaagaataccaaaatcaaagcagagttacactccagtcacaaagtaaccaccacttttaacaattcaaaagctcct	437
L N N T K K Y Q N Q S R V T L Q Y K V T T T F K Q F K A P	
cctggaaaagtgaatgtgcaacaacagccatttctgacaagaatgtggcaacacatgtagtccacagctatacttttggggcaaat	524
P G K V N V Q Q T A I S D K N V A T H V V T A I L F G A N	
gctttctttgtctttgacagtgacaaggttagaggacagcaaccttcaggacatccagggcaaaatggaagctgtgataaagaagatt	611
A F F V F D S D K V E D S N L Q D I Q G K M E A V I K K I	
ccttctgttagtattgaggggtccgggttctctgacagctgactgtagaagaaaaatctctggccagcaatctctctgcaagtttcac	698
P S V S I E G S G S V Q L T D E E K S L A S N L S C K F H	
ggagacttctcttgaagcctccctacaactttgaagaggcggtgatgacctaccagaaactccagaacttgttggagaagaa	785
G D F L L E S L P T T F E E A V M T Y Q K L P E L V G E E	
gcaagtgtatggagttccaatgaaggtgtgctagtgcccttgacaagattttattctaaagctgacgtggtccgtgacatctct	872
A S D G V P M K V W L V P L T R F Y S K A D L L V R D I S	
caaggtctagttagaaggttcacagcatcctagaagacttgcataaactgaagaggagagcccaatgattcactggaagtagacaca	959
Q G L V R K V H S I L E D L H K L K R R A N D S L E D D T	
gtgaagctgtttccactgcttgaagaagctgaaaaatttccagaaaaattatagtgtatcatgacaaccttccggaggaccatt	1.046
V K L F P L L E K K L K N F Y S D Y M T T F R R T I	
tccagaaaacttcagtcctccggaaaggagacgaagatgaactgcaatgctgcaactttttgaagatagacttagatcaccattt	1.133
S Q K L Q S I R K G D E D E T A M L Q L F E D R L R S P F	
aactcgatgtctaaactgtgtggtggaatcacagagagagagatcaatgctcaggtcctgcatgtatcatagaggaaaca	1.220
N I D S L N M W M E I T E R E I N V L R S C I D I E E T	
aagcacaggctgtcttaagttagtgagtgagtggtcaaggacctccttgactcagaggttaatgcattgctgtgtctatgtcttacc	1.307
K H K A V L S Q S Q M V K D L D S E V M H A V C Y V F T	
atgtgtgacagacaaggtatcactcctggtgacattacgtgacttgaatcgcccaacagtagacctcgagagtgacagaccgtg	1.394
Y V T D K L D A L R D Y L K S P N S R P A R V R P V	
gtaacatgggtgtctagcaacactgtactcgagacgatgagagaaaaagcccaccttttccgagccttgccaagacatggagaac	1.481
V T W V A S N T V L E A T M R E K A H L F R S L A K D M E N	
cgtgtgtccattttctgtgtgcatcgattgtaaatctgaaggttgaaaggtgagccatccactactacagggagagtggtcctaata	1.568
R C V H F L V A S I V N L K V E G A A I H Y Y R E S V L I	
gagcctaactttaaacaccccaataaagtgtgtggagaagatagtgacagaagagatttaactttgggtatgactgtgagctcacc	1.655
E P N F K H P I I S A V E K I V D R R D L L W Y D C E L T	
ctggaccacaaacacacacccgtccctgttatctgtctgtgagggcaacaagaaggcagtgactggaacactgagggcttttgacaat	1.742
L D P N T S H P S L Y L S E G N K K A V T G T L R A F D N	
aaaccagagaggttcggcctctggcagcaggtgtgtgtcaacaaggggttgagtaggcacattactgggaggtggaatgga	1.829
N P E R F G L W Q Q V L C N K G L S R R H Y W E V E W N G	
tatgttattgtcggtgttatcatattcatcaattggaaggaaaaatagacattcagagctttattgggttcagtgagacctcttg	1.916
Y V I V G G V T Y S S I G R K N I D I Q S F I G F S E T S W	
acattgatgtttatccccaaaaatggagttgtgtcaaggtgctagggagagcgtctctgactactttataagtgtatctggccttt	2.003
T L M F I P K N G V A V K G A R R S V S Y Y F I S D L A F	
ccaccactcgagctgtatcacgactgcatgctctgttttctacaaggtctcagacaatgtactgaatcactttcacacc	2.090
P P L G L Y H D C H A S T L S F Y K V S D N V L N H F H T	
attgaaatcaaacccaaattatctgagcctgtttacgccatcattctgtattggggatgaggaatgcaccttaccacggaactgtcaga	2.177
I E I K P K L S E P V Y A I I R I G D E D R P Y H G T V R	
ttacttaataataa	2.192
L L * * *	

Figura 35: Sequência nucleotídica e protéica da subunidade SpTx- α (A) de *S. plumieri*.

Notação de aminoácidos é de uma letra. A numeração de nucleotídeos está mostrada na direita. Primeiro resíduo Met (M) como códon inicial (verde). Sequências

aminoacídicas em caixas são idênticas aos peptídeos obtidos a partir da digestão trípica da toxina purificada Sp-CTx (GOMES et al., 2013). Em vermelho são mostrados os peptídeos específicos para a subunidade α e em preto o peptídeo que foi detectado em ambas as subunidades. Sequências dos primers estão sublinhadas e o domínio B30.2/SPRY reconhecido na sequência está em caixa. Códon de término são indicados por asteriscos.

A produção de SpTx- α gerou uma ORF composta de 2.106 bp, que codifica para 702 resíduos, iniciando com uma Met, seguido de duas Ser e finalizando com Leu. Nessa sequência, a primeira metionina detectada foi alinhada com as regiões N-terminais das toxinas já descritas em Scorpaeniformes e nenhum peptídeo sinal foi reconhecido na porção N-terminal da proteína precursora. A massa molecular predita da subunidade α é de 79,801 kDa e seu pI 6,7.

Em SpTx- α , oito peptídeos trípticos da toxina SpCTx previamente isolada de *S. plumieri* estão presentes na sequência deduzida da subunidade α (Figura 35). Na sequência deduzida da proteína madura, foram identificados seis sítios potenciais de glicosilação Asn localizados respectivamente nas posições 117, 124, 225, 311, 335 e 554.

A sequência protéica deduzida de SpTx- α mostrou identidade com as toxinas de lionfish (PlTx- α de *Pterois lunulata*, PvTx- α de *Pterois volitans* e PaTx- α de *Pterois antennata*), waspfish (HrTx- α de *Hypodytes rubripinnis*), stonefish (SNTX- α de *Synanceia horrida* e NeoVTX- α de *Synanceia verrucosa*) e devil stinger (IjTx- α de *Inimicus japonicus*) como mostrado na figura 36.

A

SpTx-α	MSSDIIMAG-LGRPFTLGFLYDARREKLIPGFSLFGDETLQKYATSTPQHSSDFQIVASD	59
PlTx-α	MSSEILIVAALGRPFTLGALYDSRKDRIPGFTLWEDDVLQANTVESRQSSAFEIIASD	60
PvTx-α	MSSEILIVAALGRPFTLGALYDSRKDRIPGFTLWEDDVLQANTVESRQSSAFEIIASD	60
PaTx-α	MSSEILIVAALGRPFTLGALYDSRKDRIPGFTLWEDDVLQANTVESRQSSAFEIIASD	60
HrTx-α	MSSDIMIMPGLGRPFTLGMLYDARREKLIPGFSLFGDETLQYQSSNAQRSSEFQIVASD	60
SNTX-α	-MSSDLVMPALGRPFTLGMLYDARREKLIPGFSLFGDETLQYQSSNAQRSSEFQIVASD	59
NeoVTX-α	-MSSDLVMPALGRPFTLGMLYDTRREKLIPGFSLFGDETLQYQSSNTQRSSEFQIVASD	59
IjTx-α	-MSDIIMVPALGRPFTLGMLYDTRREKLIPGFSLFGDETLQYQSSNAQRSSEFQIVASD	59
	* : : *	
SpTx-α	SVESKSNVMDIEASLGVSFLGGLVEVGGS AKYLNNTKKYQNQSRVTLQYKVTTFKQFKA	119
PlTx-α	SIEDKSSLRDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLDSSKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
PvTx-α	SIEDKSSLRDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLDSSKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
PaTx-α	SIEDKSSLRDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLDSSKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
HrTx-α	STESKSSAMDIEASLGVSFLGGLVEVGGS AKYLNNNKKYQNQSRVTLKYKSTTIYKQFTA	120
SNTX-α	STESKSSAMDIEASLGVSFLGGLVEVGGS AKYLNNTKKYQNQSRVTLKYKATTVYKQFTA	119
NeoVTX-α	STESKSSAMDIEASLGVSFLGGLVEVGGS AKYLNNTKKYQNQSRVTLKYKATTIYKQFTA	119
IjTx-α	STESKSSAMDIEASLGVSFLGGLVEVGGS AKYLNNTKKFQNQSRVTLKFYKATTVYKQFTA	119
	* *	
SpTx-α	PPGKVNVOQTASDKNVATHVVTAILFGANAFFVDS DKVEDSNLQDIQGMKMAVIKKIP	179
PlTx-α	NLETKHVEYSEYFQNL EATHVVGILYGANAFFVDS AKTESSNVQDIQGSMAAIIKKIP	180
PvTx-α	NLETKHVEYSEYFQNL EATHVVGILYGANAFFVDS AKTESSNVQDIQGSMAAIIKKIP	180
PaTx-α	NLETKHVEYSEYFQNL EATHVVGILYGANAFFVDS AKTESSNVQDIQGSMAAIIKKIP	180
HrTx-α	PPGTVKVQETAITEKGLATHVVTISILYGANAFFVDS DKVEDTNLQDIQGMKMAVIKKIP	180
SNTX-α	PPGTVTVQETAITEKGLATHVVTISILYGANAFFVDS DKVEDTNLQDIQGMKMAAIIKKIP	179
NeoVTX-α	PPGTVKVQETVITQRGLATHVVTGILYGANAFFVDS DKVEDTNLQDIQGMKMAVIKKIP	179
IjTx-α	PPGTVKVQETVITQRGLATHVVTGILYGANAFFVDS DKVEDTNLQDIQGMKMAVIKKIP	179
	* : : : *	
SpTx-α	SVSIEGSGSVQLTDEEKS LASNLSCKFHGDFFLES LPTTFEEAVMTYQKLPELVGEEASD	239
PlTx-α	SVEISGGSGSVKLTSEDSAITDRFSCKFHGDVLLPSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKEN--	238
PvTx-α	SVEISGGSGSVKLTSEDSAITDRFSCKFHGDVLLPSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKEN--	238
PaTx-α	SVEISGGSGSVKLTSEDSAITDRFSCKFHGDVLLPSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKEN--	238
HrTx-α	TISIEGSGSVQLTDEEKS LASNLSCKFHGDFFLES LPTTFEDAVKTYQTLPTLLGDSDAD	240
SNTX-α	TISIEGSGSVQLTDEEKS LASNLSCKFHGDFFLES LPTTFEDAVKTYQTLPTLLIGDGAN	239
NeoVTX-α	TISIEGSGSVQLTDEEKS LASNLSCKFHGDFFLES LPTTFEDAVTTYQTLPTLLGEDGAS	239
IjTx-α	TISIEGSGSVQLTDEEKS LASNLSCKFHGDFFLES LPTTFEDAVNTYQTLPTLLGEDGAS	239
	: : *	
SpTx-α	GVPMKVWLVPITRFYSKADLLVRDISQGLVRKVH SILEDLHKLKRRANDSLED DTVKLFP	299
PlTx-α	AVPMKVWLVPILVHFYSEAPKLMADSSISILRRVRNTLEEMRELEMR CNDALEDNTVKLFP	298
PvTx-α	AVPMKVWLVPILVHFYSEAPKLMADSSISILRRVRNTLEAMRELEMR CNDALEDNTVKLFP	298
PaTx-α	AVPMKVWLVPILVHFYSEAPKLMADSSISILRRVRNTLEEMRELEMR CNDALEDNTVKLFP	298
HrTx-α	AVPMKVWLVPILNKFYSKS QLLVREINVS KVRRIHTTLEELHALKRRANEAMDDKLVQRI	300
SNTX-α	SVPMKVWLAPLKS YNSKAQQLIQEINVS KVRRIHTTLEELHKLKRRANEAMDKLVQRI	299
NeoVTX-α	AVPMKVWLVPILKFFSKAKLLTQBITVSKVRRIHTTLEELYKLKRRANEAMDDKLVQQIP	299
IjTx-α	AVPMKVWLVPILKFFYTKAQLLIQISVSKVRRIHTTLEELHKLKRRVNEAMDDKLVQQFP	299
	* * * * * * * * : : : * : : : * * : * : * * * : : : * * : *	
SpTx-α	LLEKKIKNFQKNYS DMTTFRRTISQK LQSRKGDEDETAMLQLFEDRLRSPFNIDSLNM	359
PlTx-α	LMVKKLNNFQNLFGVYMSNLRRSIAEKLQSRSGSEDQSAMLQLFQENLKSPFNTDSLNM	358
PvTx-α	LMVKKLNNFQNLFGVYMSNLRRSIAEKLQSRSGSEDQSAMLQLFQENLKSPFNTDSLNM	358
PaTx-α	LMVKKLNNFQNLFGVYMSNLRRSIAEKLQSRSGSEDQSAMLQLFQENLKSPFNTDSLNM	358
HrTx-α	LIHDKISNFQQIFQDYILTVQKKIAEKLPLVRAGTESEQSLQKIIDREKSPFSNEKASA	360
SNTX-α	LIHDKISNFQQIFQDYMLTVQKKIAEKLPLVRAGTESEQSLQKIIDRAQSPFSNEKVS	359
NeoVTX-α	LIHDKISNFHQIFQDYMLTVQKKIAEKLPLVRAGTESEQSLQKIIDRAKSPFSNEVST	359
IjTx-α	LIHDKISNFHQIFQDYMLTVQKKIAEKLPLVRAGTESEQSLQKIIDERAQSPFSNEKVSM	359
	* : * : : : : * : : : * * * * : * * : : : : : * * * : *	
SpTx-α	WMEITEREINVLRSCHDIEETKHKAVLSQSQMVKDLLDSEVMHACVYVETVYTDKDHYL	419
PlTx-α	WMDCAEREINVLRSCHDIEEARHKVVLSESEMFRELLDSNVKHACVYVETFTVDQDPFL	418
PvTx-α	WMDCAEREINVLRSCHDIEEARHKVVLSESEMFRELLDSNVKHACVYVETFTVDQDPFL	418
PaTx-α	WMDCAEREINVLRSCHDIEEARHKVVLSESEMFRELLDSNVKHACVYVETFTVDQDPFL	418
HrTx-α	WLDAIEREIAHLKSCAGMVEGTQAKFVSNQTELDKEVLAEKVKHALCFVETTSLECIDPYL	420
SNTX-α	WLDVEREIAVLKSCAGMVEGTQAKFVSNQTELDREVLVGKVKHACVFIETTSVERNDPYL	419
NeoVTX-α	WLDVEREIAVLKSCAGMVEGTQAKFVSNQTELDREVLAEDVKHACVFIETTSVERNDPYL	419
IjTx-α	WLDAIEREIAVLKTCAGMVEGTQAKFVSNQTELDKEVLAEVDKHLGCFVETTSVERIDPYL	419
	* : : * * * * * : : * : : : * * : : : : : * * * : : * : *	
SpTx-α	DALRDYLPSPNSRPAR-VRPVVT--WVASNTVLETMREKAHLFRSLAKDME-NRCVHFLV	475
PlTx-α	KVLT DYLDSPDSRPKR-TRPPATEYWYASDTIPEMMRDKAHIFYSLAKEME-NRRVRFLV	476
PvTx-α	KVLT DYLDSPDSRPKR-TRPPATEYWYASDTIPEMMRDKAHIFYNLAKEMD-NRRVRFLV	476
PaTx-α	KVLT DYLDSPDSRPKR-TRPPATEYWYASDTIPEMMRDKAHIFYSLAEEMD-NRRVRFLV	476
HrTx-α	KVLS DYLDSPDSKDATDVMPISIQDMWFHSTEVVRKMKQTAKTFFDHVNDFEKSRNVGFFV	480
SNTX-α	KVLS DYWESPPSNNAKDVAPSTEDKWCFS TEVVLKMQQRAQTFCDHVNDFEKSRNVGFFI	479
NeoVTX-α	KVLS DYLDSPDSKDGKAEVAPSTEDKWCFS TRVVLKMQQRAQTFCDHVNDFEKSRNVGFFV	479
IjTx-α	KVLS DYLDSPDSKAAKDVSPSTEDKWCFS TGVLKMQQRAQTFCDHVNEFEKSRNVGFFV	479
	* * * * * * * * : * : * * : : : * * * : : * * * :	

SpTx-α	ASIVNLKVEGAIIHYRESVLIEPNFKHPIISAVEKIVDRRDLLWYDC	ELTLDPNTSHPS	535
PlTx-α	ASIVNPKQEGAGIHYRENILIEQEFLLQPKMNPVEKIVDRRDLLWYDC	ELTLDPVTAHPA	536
PvTx-α	ASIVNPKQEGAGIHYRENILIEQEFLLQPKMNPVEKIVDRRDLLWYDC	ELTLDPVTAHPA	536
PaTx-α	ASIVNPKQEGAGIHYRENILIEQEFLLQPKMNPVEKIVDRRDLLWYDC	ELTLDPVTAHPA	536
HrTx-α	TALENGTFQGATIIHYKEGILATQDFTFTHIPSVQGYTGRSDLLWYAC	DLTDFDRNTINNW	540
SNTX-α	TALENGKFQGASIIYYKEGSLATQDFTFPRMPFVQGYKKRSDDLWYAC	DLTDFDRNTINNW	539
NeoVTX-α	TALENGKFQGASIIHYKDGSLATQDFTFPRMPFVQGYKKRSDDLWYAC	DLTDFDRNTINIW	539
IjTx-α	AALENGKYQGASIIHYKEGSLATQDFTFPRMPFVQGYKNSDDLWYAC	DLTFNRNTINIW	539
	::: * : ** *: : * : * : * : * : * : *		
SpTx-α	LYLSEGNKKAVT--GTLRAFDNNPERFGLWQQVLCNKGLSRRHYWEVEWNGYVIVGVVTS	593	
PlTx-α	LTLSEGNKKAVS--GKPKPSDNNPERFEHFQYVLCCKQLIRRHYYWEIKWSGFVAGVTRN	594	
PvTx-α	LTLSEGNKKAVS--GKPKPSDNNPERFEHFQYVLCCKQLIRRHYYWEIKWSGFVAGVIRN	594	
PaTx-α	LTLSEGNKKAVS--GKPKPSDNNPERFEHFQYVPCCKQLIRRHYYWEIKWSGFVAGVRRN	594	
HrTx-α	VSLSDNDTFAASEHGKRQNYPKHPERFLGYNQVLCNEGLMGKHYWEVEWNGYVDVGIAYI	600	
SNTX-α	ISLSDNDTFAASEHGKRQNYPKHPERFVSFNQVLCNEGLMGKHYWEVEWNGYIDVGIAYI	599	
NeoVTX-α	VSLSDNDTFAASEHGKRQNYPKHPERFLCYNQVLCNEGLTGKHYWEVEWNGYVDVGIVAYI	599	
IjTx-α	VSLSDNDTFAASEFAKRQNYPKHPERFLGYNQVLCNEGLTGKHYWEVEWNGYVDVGIVAYN	599	
	: **: : * : : : : ***: : * *: : * : ***: : * *: : *		
SpTx-α	SIGRKNIDIQSFIGFSETSWTLMFIPKNGVAVKGARRSVSYFISDLAFPPGLGYHDCHA	653	
PlTx-α	SIHPKSSHVDSLSGSDKSWVFEYNPNTGYR-QIFKNPENNVNVSSTGFDRQGVYLDWLW	653	
PvTx-α	SIHPKSSQVDSLSGSDKSWVFEYNPNTGYR-QIFKNTPENNVNVSSTGFDRLGYYLDWLW	653	
PaTx-α	SIHPKSSQVDSLSGSDKSWVFEYNPNTGYR-QIFKNTPENNVNVSSTGFDRLGYYLDWLW	653	
HrTx-α	SIPRKEADFPSAIGYNTYSWIFRSYPKNGYL-ELHNKKETHVRVTPGFKRLGVFLDWRG	659	
SNTX-α	SIPRKEIDFASAFGYNTYSWVLSYNPKIGYI-ERHKKREYNVRAPNPGFKRLGLFLDWRY	658	
NeoVTX-α	SIPRKEEDNWVSAIGHNTCSWVFSSIPRAGYV-ERYNQRYYYVTVPFGFKQLGVFLNWD	658	
IjTx-α	SIDRKQD-WVSAIGHNNCSWVVSSTPRIGYA-ERQQRKQNYFRVNPVFKQLGVFLNWD	657	
	** * : * : ** * : * : : * : *: : *		
SpTx-α	STLSFYKVSD-NVLNHEHTIEIKPKLSEPVYAIIRIGDEDRPHYGTVRL---	702	
PlTx-α	GTLSYYMINN-NFVTHLHTFHT--LFKEAVYPAFMIGDKQN-VHGEIEL---	699	
PvTx-α	GTLSYYMINN-NFVTHLHTFHT--LFKEAVYPAFMIGDKQN-VHGEIEL---	699	
PaTx-α	GTLSYYMINN-NFVTHLHTFHT--LFKEAVYPAFMIGDKQN-VHGEIEL---	699	
HrTx-α	GSLSFYAVSS-NEVRHLHTIKT--KFTEPVYPAFGIGIGDY--HGSLRLV---	704	
NeoVTX-α	GSLSFYAVSS-DEVHHLHTFKT--KFTEPVYPAFCLGYRFD--HGTVRL---	703	
SNTX-α	GSLSFYAVSS-DEVHHLHTFKT--KFTEPVYPAFSIGPAGN--HGTLRLL---	703	
IjTx-α	GSLSFYSVSSDEVHHLHTFKT--KFTEPVYPAFICIGYRLD--NGSVRL---	703	
	:*: : : :*: : * * : * : * : *		

Figura 36: Alinhamento da sequência de aminoácidos das subunidades α (A) de Scorpaeniformes. α-subunidades de SpTx, PlTx, PvTx, PaTx, HrTx, SNTX, NeoVTX e IjTx. Notação de aminoácidos utilizada é de uma letra. Resíduos idênticos são mostrados por asterisco e substituições conservativas são indicadas por dois pontos. Resíduos de cisteína estão em branco com fundo preto. Resíduos catiônicos conservados e semi-conservados estão mostrados em cinza e alguns resíduos hidrofóbicos conservados em todas as toxinas estão em cinza escuro. Deleções estão indicadas por traços. As enumerações dos aminoácidos estão mostradas à direita de cada sequência. Acesso números (DDBJ/EMBL/GenBank): α-subunidades: PlTx de *Pterois lunulata*, AB775453; PvTx de *Pterois volitans*, AB623222; PaTx de *Pterois antennata*, AB623220; IjTx de *Inimicus japonicus*, AB775455; HrTx de *Hypodytes rubripinnis*, AB775457; NeoVTX de *Synanceia verrucosa*, AB262392; SNTX de *Synanceia horrida*, U36237.

A porcentagem da identidade da sequência aminoácídica em relação às toxinas Scorpaniformes está sumarizada na tabela 22. A identidade da sequência de SpTx-α em relação à essas toxinas variou de 53-58% e praticamente não houve variação nessas

porcentagens quando a toxina foi comparada com as subunidades β correspondentes das diferentes espécies.

Tabela 22: Identidade das sequências de aminoácidos das toxinas de Scorpaeniformes, correspondentes às subunidades α e β de *Scorpaena plumieri*, *Pterois lunulata*, *Pterois volitans*, *Pterois antennata*, *Hypodytes rubripinnis*, *Synanceia horrida*, *Synanceia verrucosa* e *Inimicus japonicus*.

Toxina	Identidade da sequência de aminoácidos (%)																
	<u>Scorpionfish</u>		<u>Lionfish</u>				<u>Waspfish</u>				<u>Stonefish</u>				<u>Devil stinger</u>		
	<u><i>S. plumieri</i></u>		<u><i>P. lunulata</i></u>		<u><i>P. volitans</i></u>		<u><i>P. antennata</i></u>		<u><i>H. rubripinnis</i></u>		<u><i>S. horrida</i></u>		<u><i>S. verrucosa</i></u>		<u><i>I. japonicus</i></u>		
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	
<i>S. plumieri</i>	α	100															
	β	54	100														
<i>P. lunulata</i>	α	58	68	100													
	β	58	74	82	100												
<i>P. volitans</i>	α	58	68	99	82	100											
	β	58	73	81	98	81	100										
<i>P. antennata</i>	α	58	67	99	82	99	81	100									
	β	58	74	80	98	81	99	80	100								
<i>H. rubripinnis</i>	α	55	45	46	47	46	47	46	48	100							
	β	55	69	72	77	72	77	72	77	47	100						
<i>S. horrida</i>	α	55	45	47	48	47	48	47	48	83	48	100					
	β	54	68	69	73	69	73	68	73	47	83	48	100				
<i>S. verrucosa</i>	α	55	45	48	50	48	50	48	50	83	48	87	49	100			
	β	54	68	69	73	69	73	69	74	47	84	49	95	50	100		
<i>I. japonicus</i>	α	53	45	48	68	48	68	48	68	81	47	84	49	90	50	100	
	β	53	68	49	73	50	73	50	73	48	83	47	90	48	90	48	100

A toxina SpTx- α contém no total sete resíduos de Cys (posições 204, 374, 406, 470, 523, 610 e 651) e somente dois deles (posições 470 e 651) não são conservados quando comparadas com outras toxinas de Scorpaeniformes.

Na sequência “*in silico*” de SpTx- α foram identificadas inserções/deleções de um ou dois aminoácidos em várias posições. Um total de sete inserções (posições 238, 239, 625, 676, 677, 694 e 695) foram detectadas, sendo que as inserções 625, 676, 677, e 694 foram encontradas exclusivamente em SpTx- α . Em relação às deleções, foram detectadas oito deleções nas posições 10, 436, 442, 443, 468, 548, 549 e 664, sendo que as posições 10, 442 e 443 foram exclusivas da toxina de *S. plumieri*.

Uma pesquisa utilizando a ferramenta PROSITE (HULO et al., 2006) revelou que SpTx- α contém um domínio B30.2/SPRY na região C-terminal, similar a outras toxinas de Scorpaeniformes, o domínio localiza na posição 505-702, totalizando 197 resíduos.

Proteínas que contém domínios B30.2 mostram similaridades entre eles e três motivos são altamente conservados, nomeados LDP, WEVE e LDYE. Para identificar a presença do domínio, foi realizada uma pesquisa na procura do domínio B30.2 utilizando o algoritmo tBLASTn (ALTSHUL et al., 1990). A tabela 23 mostra o resultado da busca e a presença dos três motivos consensos.

A família de proteínas com domínios B30.2 diferem entre si na região N-terminal. O primeiro grupo da família contém no domínio N-terminal, os motivos BBox e coiled-coil associados com o motivo RING finger e são encontradas em um grupo de proteínas RING finger, tais como: o RFP- Ret Finger Protein fator nuclear, o autoantígeno de 52 kDa (antígeno nuclear A da síndrome de Sjogren's) Ro/SSa 52 kDa, a proteína finger ácida (AFP), o regulador de transcrição, a proteína Staf-50 e a proteína RING finger B30 (RFB30). Outros dois membros dessa família contém uma região adicional N-terminal com caráter ácido, como o fator nuclear 7 de *Xenopus laevis* (XNF7) e o fator nuclear (pAw33) de *Pleurodeles waltl*. Outros membros dessa família apresentam variações estruturais, como é o caso da KIAA0129, o qual não contém motivo RING e o domínio B30.2 é truncado, enquanto que, a proteína estrógeno finger (efp) possui dois motivos BBox.

No segundo grupo da família B30.2, o domínio N-terminal é associado com dois domínios de imunoglobulinas (IgV-IgC1), como é o caso das proteínas transmembrânicas, butirofilina e a proteína BT2. E, por fim, o terceiro grupo de domínio N-terminal foi descrito para algumas proteínas que não apresentam similaridade com outras presentes no banco de dados, como foi inicialmente relatado na região C-terminal da toxina SNTX (subunidades α e β).

Neste trabalho, na porção C-terminal da subunidade α de SpTx foram identificados três motivos, o LDP na posição 527-529, o LDYE na posição 647-650 (com modificações) e o WEVE na posição 578-581. Tais motivos apresentaram similaridades com a predição de motivos da SNTX, embora algumas modificações foram observadas (Tabela 23).

Tabela 23: Motivos LDP, WEVE e LDYE membros da família B30 obtidos no banco de dados com o algoritmo tBLASTn.

Proteínas	ID	LDP	WEVE	LDYE
(hum) RFP	gb: J03407	VDVTLDPDTAYPSLILSDN	FIAGRHYWEVEV	PLQRVGIFLDYDAGEVSFYN
(mice) RFP	pir: S37583	VDVTLDPDTAYPSLILSDN	FMAGRHYWEVEV	PLQRVGIFLDYDAGEVSFYN
(hum) Ro/SSa 52	pir: A37240	VHITLDPDTANPWLILSED	FHSGKHYWEVDV	PPCQVGIFLDYEAGMVSFYN
(mice) Ro/SSa 52	gb: L27990	VDVTLDPDTAHPHLFLYED	FSSGKMYWEVDV	PPCQVGIFLDYEAGMVSFYN
(hum) AFP	gb: U09825	VSVTLDPQSASGYLQLSED	FTWGVVYWEVEV	RPRRVGIALDYEAGGVTFTN
(<i>xenopus</i>) XNF7	pir: A43906	TMPLLDPTSAPNLHLSDG	FDSGRHYWEVEV	HPRKIGVYVDYEGGQISFYN
(<i>pleurodele</i>) pAw33	sp: Q02084	LDVTLDPNTAHPNLVLESEG	FDSGKHYWEVEV	PLAEYGVFLDYDAGDISFYN
(bov) butirofilina	sp: P18892	VDVTLDPDTAHPHLFLYED	FTSGRHYWEVEV	PPRRVGVLFDYDAGDISFYN
(mice) butirofilina	gb: S80642	VDVTLDPDTAHPHLFLYED	FTSGRHYWEVEV	PPRRVGVLFDYDAGDISFYN
(hum) butirofilina	gi: U39576	VDVTLDPDTAHPHLFLYED	FTSGRHYWEVEV	PPRRVGIFLDYDAGDISFYN
(hum) RFB30	Em: Y07829	AHISLDPQTSHPKLLSED	ITGGRHTWVVS	QPRQVRVSLDYEAGVVTFTN
(hum) efp	pir: A49656	IKVILDYNTAHNKVASEC	YKKGIIHYWEVEL	KATRVGVLLNCDHGFVIFFA
(mice) efp	gb: D63902	FKVIFDYNTAHNKVSLSNK	YKNGIIHYWEVEL	KATRVGVLLNCDHGFVIFFA
(hum) Staf 50	gb: X82200	VDVMLPNSGATSNAISVD	FSSGKYWEVDV	APCRIGVFLDYEAGIVSFFN
(hum) KIAA0129	gb: D50919	RTPTLDPDTMHARLRLSAD	FATGRHYWEVDV	PPRRLGVFLDYEAGVLAFFD
(<i>Synan.</i>) SNTX- α	gb: U36237	CDLTDFDRNTINNWLISDN	GLMGKHYWEVEW	GFKRLGLFLDWRYGSISFYA
(<i>Synan.</i>) SNTX- β	gb: U32516	CELTLDPEAHQVLTLESEG	GLSGRHYWELEW	GFKLLGVYLDWPAGTLSFYM
(<i>Scorp.</i>) SpTx- α	no press	CELTLDPNSTHPSLYLSEG	GLSRRHYWEVEW	AFPPLGLYHDCASTLSFY
(<i>Scorp.</i>) SpTx- β	no press	TVSSPWKETAHAPALHLESEG	GLSKRHYWEVEW	GFDRGLGVYLDWPAGTLSFYM

*Em cinza estão mostrados os motivos identificados.

3.8.2. Identificação, construção quimérica e propriedades de SpTx- β de *S. plumieri*

Para a caracterização da subunidade β , foi necessária a clonagem de pelo menos dois fragmentos de DNA (Figura 27C e 37). A relação dos primers utilizados está mostrada na tabela 20 e são referentes às regiões da subunidade β que contribuem para identificar a estrutura completa da proteína. Após várias tentativas de identificação de componentes da subunidade β com diferentes combinações de primers em reações de PCRs, seguidas por sequenciamento de DNA, um amplicon correspondente a esta subunidade foi obtido com o par de primers CD β -f e CD β -r. Esse par de primers CD β foi construído baseando-se em regiões que contém resíduos de cisteínas conservadas e correspondentes às posições 1.165-1.182 e 1.621-1.638 referentes à sequência da SNTX/Subunidade β (Figura 26).

Após amplificação com os primers CD β foi gerado um fragmento de aproximadamente 400 bp, como mostrado na figura 37A, o qual foi clonado e sequenciado.

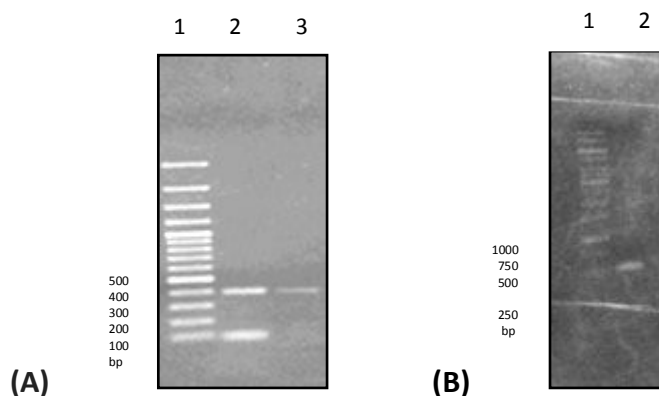


Figura 37: Géis de agarose 1% dos fragmentos de DNA referentes às regiões da subunidade β identificados em *S. plumieri* utilizando diferentes combinações de primers. (A): 1- 100 bp DNA Ladder, 2- CD β -f e CD β -r, 3- CD β -f e CD β -r* (após purificação em coluna GFX). (B): 1- 1 kb DNA Ladder, 2- CD β -f e Syn β -r*. Fragmentos clonados em pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning®.

Após edição e remoção do vótor, a sequência consenso totalizou 471 bp e foi identificada com auxílio da ferramenta Translate/Expasy uma ORF de 468 bp que codifica 156 resíduos. O alinhamento da sequência usando o algoritmo BLASTn revelou similaridade acima de 70% com as subunidades β encontradas em Scorpaeniformes (Tabela 21, CD β -f e CD β -r). Análises da sequência de aminoácidos mostram quatro resíduos de Cys conservados e localizados nas mesmas posições que outras toxinas-like de peixes-escorpião.

Paralelamente, como descrito na seção anterior, com os primers degenerados foram obtidos produtos de amplificação, a saber: Deg1-f e Deg-r produziu um amplicon com 1.000 bp, como mostrado na figura 33C. A clonagem e sequenciamento deste fragmento resultou em uma sequência consenso de 1.201 bp que alinhou fortemente com as subunidades β descritas em outros Scorpaeniformes (Tabela 21, Deg1-f e Deg-r). Quando essa sequência foi traduzida “*in silico*” foi identificada uma ORF de 948 bp correspondente a 316 resíduos, que alinhou com 74% de identidade com a subunidade β de *Pterois lunulata* (PITx- β), nas posições de 78-394.

Outro fragmento correspondente a subunidade β foi previamente obtido juntamente com um referente à subunidade α (Figura 33C), confirmado após a clonagem do produto em pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA. O sequenciamento dos insertos Deg2 resultou em uma sequência consenso de 1.215 bp que, como o fragmento Deg1 alinhou fortemente com as subunidade β de Scorpaeniformes (Tabela 21, Deg2-f e Deg-r). Quando a sequência consenso foi traduzida “*in silico*” foi identificada uma ORF de 1.104 bp correspondente a 368 resíduos, que alinhou com 47% de identidade entre as posições 163-531 com a subunidade β de *Pterois lunulata* (PITx- β).

Após tentativas de amplificações utilizando combinações do primer CD β -r com aqueles localizados na região 5', tais como Deg1-f, Deg2-f, Cat-f, Cat β -f, β_T -f e β_2 -f, somente com o par β_T -f e CD β -r (Tabela 20) se gerou um fragmento de 1.500 bp por screening da biblioteca utilizando reações de PCRs, como já mostrado anteriormente na figura 27C e seção 3.7.: “Screening da biblioteca de cDNAs pelo método de PCR”. Como já mencionado nessa seção, esse fragmento produziu uma ORF de 1.545 bp que codifica 515 resíduos incluindo o códon inicial ATG posicionado na posição 72 e alinhado com o primer β_T -f, o que sugere ser o início da subunidade β .

Uma vez reconstruído o fragmento que codifica a subunidade β abrangendo desde o extremo N-terminal até a posição 517, em relação às outras subunidades β de Scorpaeniformes, foi construído um primer forward complemento, designado CD β r-f, para a obtenção do fragmento que corresponde à região C-terminal da subunidade.

Esse primer CD β r-f foi combinado com o primer Syn β -r e após PCR na presença de cDNAs foi detectado um amplicon de 500 bp, como mostrado na figura 37B. Após a clonagem, sequenciamento e edição, a sequência consenso do fragmento CD β r-f e Syn β -r totalizou 547 bp. Esse fragmento foi analisado com a ferramenta BLASTn e revelou um alinhamento significativo com toxinas de Scorpaeniformes (Tabela 21, CD β r-f e Syn β -r). Com auxílio da ferramenta Translate/ExPASy, foi identificada uma ORF de 543 bp que gerou um peptídeo de 181 resíduos, que alinhou com a subunidade β de Scorpaeniformes, a partir da posição 531 até o extremo C-terminal.

Uma vez obtido os fragmentos β_T -f e CD β -r e CD β r-f e Syn β -r foi reconstruída a subunidade β quimérica, como ilustrado na figura 34B. Foi possível identificar uma região gênica que abrange 2.180 bp para a subunidade β de *S. plumieri*. A toxina quimérica descrita nesse trabalho foi nomeada de SpTx- β .

A estrutura completa da subunidade β putativa de *S. plumieri* foi elucidada como mostrado na figura 38. Nesta sequência foi detectada na posição 72-74 o códon de iniciação (ATG) e na mesma janela de leitura na região 3' um códon de término (TAA) na posição 2.178-2.180. O sinal (AATAAA) e a cauda poli (A) não foram identificadas na região 3' não-traduzida.

B

gacatggggtataaaaaaaatttcaactttgtcaaaaagcagggtccgaattcgcccttgttggagtc	89
gtgggtggctgcccgtgggtcgacctttaccttaggagcactctacgatgctcgaaagataaactgtaccaggtttcacattgtgg	176
gaacatgaagttctagaagagacacagttgaaagtgtacgcccagcagcacatttgaatcaactgcatctgattccattgacgac	263
aagtcttctctgatgatatggaagcttctctgaaagctagtttctcgggtggactgatagaagtggaggatctgccaagtacctg	350
aatgataccaagaattcaagaccagagtcaggtgacacttctcagtcacaaagctaccaccagctttaaaccagctgatgactaatctc	437
ttctttgtctttgacagtgacaaagtagattctagcaatgttcaggacatccagggcagcatggaagctgtgataaagaaaattccc	524
gaaacaaaacatgtagaattatttgaatatttccagaacattgaggcaactcatgtcgtgatagggtacctctacggggcaaatgct	611
ttctttgtctttgacagtgacaaagtagattctagcaatgttcaggacatccagggcagcatggaagctgtgataaagaaaattccc	698
gacttccacctcccaagtaaccctacaacttttgaggatgcagttaaaacctaccagcaacttccacaaaatgatggggaagagacg	785
gctgttccaatgacagctcgtgctgctgcaaatgttcttctgaagcacctcaactgatggctgatagcagcactccaata	872
cttaggaaggttgtaacactctggaagccatgaggcaacttgatgagatgcaacgattcactggaaaagcagacacagtgaaagct	959
ggtttccactgcttgaaaaagaagctgaaaaagctttcagaacactatgaaaggttacatgtcaaccccttccggaagaaccatttc	1.046
ccagaaactttcagtcacatcccggaagggacgaagatgaaactgcaatgcttcccaacttttcgaaataaacttagatcaccatcc	1.133
aacatcaatagtctaaacatgtggatggactgtgcagagagagagataaatgttctcaggtcctcgtcattgatattatagaggaagca	1.220
atgtgtgacagactacatcccttctcgaacgctctcagtgatttctcgaatcgattaaacctaaagaaatagtcacatcaaaaaa	1.307
gactactggtatacttcagatgtgtaccagagatgatgagagaaaaagccaccatttctacaacctggccaagacatggaagaaac	1.394
atcaatgactttgacaaatcctcggtattctcctgtggagaccatacaagccaagagagttactctggtatgactgtgagctcacc	1.481
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	1.568
atcaatgactttgacaaatcctcggtattctcctgtggagaccatacaagccaagagagttactctggtatgactgtgagctcacc	1.655
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	1.742
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	1.829
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	1.916
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	2.003
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	2.090
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	2.177
tgaaagaacagcacatccggccctgcacctgtctgagggcaacaagaaggcaatgtctggaaccacagccatctgacaataac	2.180

Figura 38: Sequência nucleotídica e protéica da subunidade SpTx- β (B) de *S. plumieri*.

Notação de aminoácidos é de uma letra. A numeração de nucleotídeos está mostrada na direita. Primeiro resíduo Met (M) como códon inicial (verde). Sequências aminoacídicas em caixas são idênticas aos peptídeos isolados a partir da digestão trípica da toxina purificada Sp-CTx (GOMES et al., 2013). Em vermelho são mostrados os peptídeos específicos para a subunidade β e em preto o peptídeo que foi detectado

em ambas as subunidades. Sequências dos primers estão sublinhadas e os domínios B30.2/SPRY reconhecidos na sequência está em caixa. Códon de término são indicados por asteriscos.

A identidade de SpTx- β com a correspondente janela de leitura foi estabelecida e confirmada pela presença de doze peptídeos trípticos previamente obtidos da digestão da toxina Sp-CTx de *S. plumieri*. A ORF completa é composta de 2.106 bp e codifica para 702 resíduos de aminoácidos. O códon de iniciação contém uma Met, seguido por Pro e Ser e finaliza com um resíduo Glu. Como verificado para a subunidade α , nenhum peptídeo sinal foi reconhecido na porção N-terminal da proteína e a subunidade β possui uma massa molecular predita de 80,126 kDa e pI 7,88. Na sequência deduzida da proteína, foram reconhecidos quatro sítios Asn com potencial de glicosilação nas posições: 117, 124, 239 e 309, sendo as duas primeiras também identificadas nas mesmas posições da subunidade α .

O alinhamento da sequência protéica mostra que a subunidade SpTx- β é altamente homóloga em relação às outras subunidades β descritas de Scorpaeniformes. A sequência de SpTx- β mostrou similaridade com as seguintes toxinas de Scorpaeniformes: lionfish (PlTx- β de *Pterois lunulata*, PvTx- β de *Pterois volitans* e PaTx- β de *Pterois antennata*), waspfish (HrTx- β de *Hypodytes rubripinnis*), stonefish (SNTX- β de *Synanceia horrida* e NeoVTX- β de *Synanceia verrucosa*) e devil stinger (IjTx- β de *Inimicus japonicus*) como mostrado na figura 39.

B

SpTx- β	MPSDILVVAALGRPFTLGALYDARKDKLYPGFTLWEHEVLEESTVESDQPSSTFEITASD	60
PlTx- β	MSSQILVVAALGRPFTLTGLYDARKDRLIPGFTLWEDDVLQANTVESRQPSAFEIIASD	60
PvTx- β	MSSQILVVAALGRPFTLTGLYDARKVRLIPGFTLWEDDVLQANTVESRQPSAFEIIASD	60
PaTx- β	MSSQILVVAALGRPFTLTGLYDARKDRLIPGFTLWEDDVLQANTVESRQPSAFEIIASD	60
HrTx- β	MSSDILVVPALGRPFTSLGALYDARKDKLIPGFTLWDDVLEESTVESSQPSAFEIIASD	60
SNTX- β	MPSDILVVAALGRPFTLGMLYDARNDKLIIPGFTLWEDEVIEESTLESSQPSAFEIIASD	60
NeoVTX- β	MPSDILVVAALGRPFTLGMLYDARNDKLIIPGFTLWEDEVIEESTVESSQPSAFEIIASD	60
IjTx- β	MPSDILVVAALGRPFTLGMLYDARNDKLIIPGFTLWDEVLDESTVESSQPSAFEIIASD	60
	* * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
SpTx- β	SIDDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLNDTKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
PlTx- β	SIEDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLDDRRKKSKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
PvTx- β	SIEDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLDDRRKKSKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
PaTx- β	SIEDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLDDRRKKSKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
HrTx- β	SIDDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLNNQKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
SNTX- β	STDDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLNNQKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
NeoVTX- β	SIDDKSSLMDIEASLKASFLGGLVEVGGS AKYLNNQKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
IjTx- β	SIDDKSFLMDIEASLEASFLGGLVEVGGS AKYLNNQKKFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMT	120
	* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	

SpTx-β **NLETKHVEYSEYFQNIETHVHVGILYGANAFFVFDSDKVDSSNVQDIQGSMEAVIKKIP** 180
 PlTx-β NLETKHVEYSEYFQNIETHVHVGILYGANAFFVFDSDKVDSSNVQDIQGSMEAAIKKIP 180
 PvTx-β NLETKHVEYSEYFQNIETHVHVGILYGANAFFVFDSDKVDSSNVQDIQGSMEAAIKKIP 180
 PaTx-β NLETKHVEYSEYFQNIETHVHVGILYGANAFFVFDSDKVDSSNVQDIQGSMEAVIKKIP 180
 HrTx-β NLGTHVEYSELFENIQATHVHVGILYGANAFFVFDSDNKVDSTNVQEIQQGMEAVIKKIP 180
 SNTX-β NLGTHVEYSELFENIQATHVHVGILYGANAFFVFDSDNKVDSTNVQEIQQGMEAVIKKIP 180
 NeoVTX-β NLGTHVEYSELFENIQATHVHVGILYGANAFFVFDSDNKVDSTNVQEIQQGMEAVIKKIP 180
 IjTx-β NLGTHVEYSELFENIQATHVHVGILYGANAFFVFDSDNKVDSTNVQEIQQGMEAVIKKIP 180
 ** ***** *: : : ***** * : : : ***** ** *****

SpTx-β **SVEISGQGSVQLTSEESDITNSFSCFHHGDFHFLPSNPTTFEDAVKTYQQLPQMMGKETAV** 240
 PlTx-β SVEISGQGSVQLTSEESDITNSFSCFHHGDFHFLPSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKENAV 240
 PvTx-β SVEISGKGEVKLTSEESDITNSFSCFHHGDFHFLPSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKENAV 240
 PaTx-β SVEISGKGEVKLTSEESDITNSFSCFHHGDFHFLPSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKENAV 240
 HrTx-β SVEISGKAVTLTSEESDITNSFSCFHHGDFHFLTSNPTTFEDAVQTYQQLPQMMGKENAV 240
 SNTX-β SVEISGKASVQLTGEETDITNSFSCFHHGDFHFLTNTPTTFEDAVKTYQQLPQMMGKDNVAV 240
 NeoVTX-β SVEISGKASVQLTSEETDITNSFSCFHHGDFHFLTSNPTTFEDAVKTYQQLPQMMGKDNVAV 240
 IjTx-β SVMMSGKASVQLTSEESDITNRFSCFHHGDFHFLTSNPTTFEDAVKTYQQLPQMMGKDNVAV 240
 ***: : : * * : : * * : : : * : : : : : : : : : : : *

SpTx-β **PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAMRQDMRCNDSLERRHSEAGFHC** 300
 PlTx-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAIRELEMRONDALEDNTVKL-FPL 299
 PvTx-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAMRELEMRONDALEDNTVKL-FPL 299
 PaTx-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAMRELEMRONDALEDNTVKL-FPL 299
 HrTx-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAIVQVQMRONDALDDPIVNL-FPO 299
 SNTX-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAIVQVQMRONDALDDPTVNL-FTE 299
 NeoVTX-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAIVQVQMRONDALDDPTVNL-FTE 299
 IjTx-β PMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSTPIILRKVRNTLEAIVQVQMRONDALDDPIVNL-FTE 299
 *: : : : : : : : : : : : : : : : : *

SpTx-β **LKKKLKTFQKHRYERLHVNPFRKNHFFETFPSGKGTMMKLQCLPTFRNKLKSPSNINSLN** 360
 PlTx-β IEKKLNNFKNFFGDYMLN--LRRTIAEKLQSIIRSGSEDQSAMLQLFQENLKSPFNIDSLN 357
 PvTx-β IEKKLNNFKNFFGDYMLN--LRRTIAEKLQSIIRSGSENASAMLQLFQENLKSPFNIDSLN 357
 PaTx-β IEKKLNNFKNFFGDYMLN--LRRTIAEKLQSIIRSGSENASAMLQLFQENLKSPFNIDSLN 357
 HrTx-β VRKKLSNFQNFCDHKLK--LQATIAKKLLAIRSGDEDESAILNVFEENLQSPFNIESLN 357
 SNTX-β VQKKLSDFQKICDDHMSK--LQATIAKKLLFAIRSGDEDESALLNFEENLQSPFNIESLN 357
 NeoVTX-β VQKKLSDFQKICDDHMSK--LQATIAKKLLFAIRSGDEDESALVNLFEENLQSPFNIESLN 357
 IjTx-β VQKKLSDFQKICDDHMSK--LQATIAKKLLFAIRSGDEDESALLNFEENLQSPFNIESLN 357
 : * * : : : : : * : : : * : : : : *

SpTx-β **MWMDCAEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF** 420
 PlTx-β MWMDCAEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 PvTx-β MWMDCAEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 PaTx-β MWMDCAEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 HrTx-β QWMDFEEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 SNTX-β MWMDFEEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 NeoVTX-β MWMDFEEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 IjTx-β QWMDFEEREINVLRSIDIIIEARHKVVLSESEMFRELLDPNVKHAVCYVFTVTDQDPF 417
 *: : : : : : : : : : : : : : : : *

SpTx-β **LNALSDFSKS--IKPKKYSPSKDYWYTSDDVEEMREKAHHFYNLAKDMENRCVRFIVA** 478
 PlTx-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMREKAHHFYNLALDMDNRCVRFIVA 477
 PvTx-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMRAKAHHFYNLALDMDNRCVRFIVA 477
 PaTx-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMRAKAHHFYNLALDMDNRCVRFIVA 477
 HrTx-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMREKALFRNLSEEMNRCVRFIVA 477
 SNTX-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMREKALFRNLSEEMNRCVRFIVA 477
 NeoVTX-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMREKALFRNLSEEMNRCVRFIVA 477
 IjTx-β LNLSDFLSDSPSKPKKLRPSTKDYWYISDDVEEMREKALFRNLSEEMNRCVRFIVA 477
 * * : : : : : : : : : : : : : : : *

SpTx-β **SIVNKEEGAAIHYYREGIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL** 537
 PlTx-β SIGNPKQEGAGIHYYREGIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 PvTx-β SIGNPKQEGAGIHYYREGIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 PaTx-β SIGNPKQEGAGIHYYREGIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 HrTx-β SIYDEPKQEGAGIHYYRESIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 SNTX-β AIHNPKEEGAAIHYYRESIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 NeoVTX-β AIHNPKEEGAAIHYYRESIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 IjTx-β AIHNPKEEGAAIHYYRESIQLINDFSNPRIIPVETIQDQESYSGMTVSSPWK-ETAHPAL 537
 : * : : : : : : : : : : : : : : : *

SpTx-β **HLSEGNKKAVSGKPKPFDNQRRFECYQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG** 597
 PlTx-β TLSEGNKKAVSGKPKPFDNQRRFECYQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 PvTx-β TLSEGNKKAVSGTAKPFDNQRRFECYQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 PaTx-β TLSEGNKKAVSGTAKPFDNQRRFECYQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 HrTx-β ALSEGNKKAVSGTKPYDNHFERFSHFQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 SNTX-β TLSEGNKKAVSGTKPYDNHFERFSHFQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 NeoVTX-β TLSEGNKKAVSGTKPYDNHFERFSHFQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 IjTx-β TLSEGNKKAVSGTKPYDNHFERFSHFQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGVITYKGIG 597
 *****: : : : : : : : : : : : : : : *

```

SpTx-β      RKTFASEC SLGHTDMSVVFDDYFPKSGYHHIYNKKVRVKVASPGEDRLGVYLDWPAGTLS 657
PlTx-β      RRTWNQDSSLGHNKISWVFDFPKSGYNHIFDAKKTKVNVSSPGFKKLGIYLDWPAGTLS 657
PvTx-β      RRTWNQDSSLGHNKISWVFDFPKSGYNHIFDAKKTKVNVSSPGFKKLGIYLDWPAGTLS 657
PaTx-β      RRTWNQDSSLGHNKISWVFDFPKSGYNHIFDAKKTKVNVSSPGFKKLGIYLDWPAGTLS 657
HrTx-β      KNSSTSDSSSLGYNEKSNVLEYSPKSGYQLIENGKKTRVSVSSPGFEQLGVYLDWPAGTLS 657
SNTX-β      RKTSTSDSSSLGKNEKSNLFEYSTKSGYQQIHNSKKTRVTVSSGFKLLGVYLDWPAGTLS 657
NeoVTX-β    RKTSTPDSSSLGKNQKSNVFEYTKKSGYQQIHNGKNARVTVSSIGFKQLGVYLDWPAGTLS 657
IjTx-β      RNTSNDSSSLGNNEKSNVFEYSSKSGYQQIENGKKTRVTVSSGFKQLGVYLDWPAGTLS 657
: :      : * * *      * * : : *      * * * : * : * : * *      * * : * * * * * * * *

SpTx-β      FYMVTSTWVTHLHTFSIRFNEAVYPAFLIGHGQKNANGQIKLKE 702
PlTx-β      FYMVDTIWVTHLHTFKARFQEAVFPAFLIGHGSD--NGQIKLL-- 698
PvTx-β      FYMVDTIWVTHLHTFKARFQEAVFPAFLIGHGPD--NGQIKLL-- 698
PaTx-β      FYMVDTIWVTHLHTFKARFQEAVFPAFLIGHGPD--NGQIKLL-- 698
HrTx-β      FYMVSKAVVTHLHTIKTKFYEAVYPAFLIGNAQQ--NGRIKLL-- 698
SNTX-β      FYMVNKAQVTHLHTFHTKENEAVYPAFLIGDAQQKVNGQIKLL-- 700
NeoVTX-β    FYMVNKAQVTHLHTFHTKFEAVYPAFLIGDAQQKVNGQIKLL-- 700
IjTx-β      FYMVKKPWVTHLHTFRTKTHEAVYPAFHIGDAQKKTNGQIKLL-- 700
* * *      * * * : * : : * * * : * *      * * : * *

```

Figura 39: Alinhamento da sequência de aminoácidos das subunidades β (B) de Scorpaeniformes. β-subunidades de SpTx, PlTx, PvTx, PaTx, HrTx, SNTX, neoVTX e IjTx. Notação de aminoácidos utilizada é de uma letra. Resíduos idênticos são mostrados por asterisco e substituições conservativas são indicadas por dois pontos. Resíduos de cisteína estão em branco com fundo preto. Resíduos catiônicos conservados e semi-conservados estão mostrados em cinza e alguns resíduos hidrofóbicos conservados em todas as toxinas estão em cinza escuro. Deleções estão indicadas por traços. As enumerações dos aminoácidos estão mostradas à direita de cada sequência. Acesso números (DDBJ/EMBL/GenBank): β-subunidades: PlTx de *Pterois lunulata*, AB775454; PvTx de *Pterois volitans*, AB623223; PaTx de *Pterois antennata*, AB623221; IjTx de *Inimicus japonicus*, AB775456; HrTx de *Hypodytes rubripinnis*, AB775458; NeoVTX de *Synanceia verrucosa*, AB262393; SNTX de *Synanceia horrida*, U32516.

A identidade de SpTx-β com as subunidades β de diferentes gêneros de peixes-escorpião variou entre 68-74% (Tabela 22), sendo 73-74% com espécies de lionfish e menores identidades (68-69%) com as toxinas descritas em waspfish, stonefish e devil stinger.

A toxina SpTx-β contém no total onze resíduos de Cys (posições 205, 285, 300, 339, 362, 373, 405, 471, 569, 644, 665), sendo que seis deles (posições 205, 285, 373, 405, 471 e 569) se encontram nas mesmas posições quando comparadas com as subunidades β de outros Scorpaeniformes (Figura 39). Quatro resíduos de Cys (posições 300, 339, 644 e 665) são exclusivos de SpTx-β e uma das Cys (posição 362) foi conservada em relação a *Pterois*.

Na sequência de SpTx- β foram identificadas sete inserções (posições 297, 319, 320, 692, 693, 701 e 702) quando comparadas com as outras toxinas, sendo que os aminoácidos das posições 692 e 693 foram deletados somente nos genes de *Pterois* e *Hypodytes*. Após alinhamento de SpTx- β com as toxinas Scorpaeniformes foram verificados dois resíduos adicionais antes do códon final de término. Em relação às deleções gênicas, em SpTx- β foram verificadas três deleções, nas posições 428, 429 e 530.

Uma pesquisa no banco de dados PROSITE (HULO et al., 2006) revelou que SpTx- β contém um domínio B30.2/SPRY na região C-terminal, localizado na posição 504-702, similar ao encontrado em outras toxinas de Scorpaeniformes. Nessa região os três motivos comuns ao domínio B30.2 foram identificados: o LDP na posição 528-530 e o LDYE na posição 648-651 (ambos com modificações) e o motivo WEVE detectado na subunidade β na posição 579-582 (Tabela 23).

3.8.3. Comparação das estruturas primárias de SpTx- α e SpTx- β

Como mostrado na figura 35 e 38, as sequências deduzidas de SpTx- α e SpTx- β de *S. plumieri* contém 702 resíduos. O alinhamento das sequências de ambas as subunidades (Figura 40) mostra que elas são consideravelmente homólogas, apresentando um total de identidade de 54% e uma similaridade de 76%. Várias inserções/deleções de um ou dois aminoácidos são evidentes quando as duas subunidades são comparadas.

SpTx-α	MSSDIIMAG-LGRPFTLGFLYDARREKLIPGFSLFGDETLQKYATSTPQHSSDFQIVASD 59
SpTx-β	MPSDILVVAALGRPFTLGALYDARKDKLYPGFTLWEHEVLEESTVESDQPSSTFEITASD 60
	* **::: ***** **::: ** **::: * **::: : : * ** * * **
SpTx-α	SVESKSNVMDIEASLGVSFLGGLVEVGGS AKYLNN TKYQNQSRVTLQYKVTTFKQFKA 119
SpTx-β	SIDDKSSLMDIEASLKASFLGGLIEVGGS AKYLNDTKKFNQSRVTLQYKATTSFKQLMT 120
	*:: ** : ***** *****:*****:*****:***** **::**:::
SpTx-α	PPGKVNQQTAISDKNVATHVVTAILFGANAFFVFDSDKVEDSNLQDIQGKMEAVIKKIP 179
SpTx-β	NLETKHVEYSEYFQNIETHVVGILYGANAFFVFDSDKVDSSNVQDIQGSMEAVIKKIP 180
	:*:: : : ***** **::*****: **::***** *****
SpTx-α	SVSIEGSGSVQLTDEEKSLASNLSCKFHGDFFLLESLPTTFEEAVMTYQKLPELVGEEASD 239
SpTx-β	SVEISGQGSVQLTSEESDITNSFSCKFHGDFHLPNPTTFEDAVKTYQQLPQMMGKET-- 238
	** * * ***** ** : : ***** * * *****: ** **::**:::
SpTx-α	GVPMKVWLVPPLTRFYSKADLLVRDISQGLVRKVHSELDLHKLKRRANDSLED DTVKL-F 298
SpTx-β	AVPMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSSPTILRKVRNTLEAMRQLDMRCNDSLERRHSEAGF 298
	** * *****: * **::* **::* * :***: ** :::* * ***** : *

Toxinas de Scorpaeniformes em geral mostram alta identidade e similaridade entre as subunidades α e β , embora não alinhem com outras proteínas conhecidas no banco de dados. Foi verificado que a identidade entre as subunidades de SpTx foi menor quando comparada com as toxinas de lionfish, que compartilham aproximadamente 80% de identidade. Igualmente como SpTx, as toxinas de waspfish, devil stinger e stonefish mostram identidade entre as suas subunidades α e β que variam de 47-50% (Tabela 22).

As sequências deduzidas das subunidades α e β contém ao todo 18 resíduos de cisteínas (7 na subunidade α e 11 na subunidade β). O alinhamento das duas sequências na figura 40 revela que cinco resíduos de cisteína localizados nas posições 204, 374, 406, 470 e 568 são conservados entre as subunidades. Em adição, ambas as subunidades compartilham a presença de um N-terminal com muitos resíduos

hidrofóbicos, bem como a presença de vários resíduos catiônicos também conservados entre outras toxinas de Scorpaeniformes.

O tamanho das subunidades α e β de SpTx foram comparadas com as toxinas de Scorpaeniformes. Como mostrado na tabela 24, as duas subunidades descritas em *S. plumieri* neste trabalho foram as únicas que apresentaram janela de leitura com o mesmo tamanho (702 resíduos aminoácidos cada subunidade), enquanto que, no gênero *Pterois*, as subunidades α (699 resíduos aminoácidos) possuem um resíduo adicional em relação às subunidades β (698 resíduos aminoácidos). As subunidades β de *Hypodytes*, *Synanceia* e *Inimicus* possuem uma janela de leitura com 700 aminoácidos e as subunidades α variaram, sendo formadas por 704 resíduos aminoácidos em *Hypodytes* e *Inimicus* e um resíduo a menos em *Synanceia*.

Tabela 24: Comparação do tamanho das subunidades α e β das espécies: *Scorpaena plumieri*, *Pterois lunulata*, *Pterois volitans*, *Pterois antennata*, *Hypodytes rubripinnis*, *Synanceia horrida*, *Synanceia verrucosa* e *Inimicus japonicus*.

Scorpaeniforme	Subunidade	nucleotídeos (bp)	ORF
<i>S. plumieri</i>	α	2.192	702
	β	2.180	702
<i>P. lunulata</i>	α	2.243	699
	β	3.074	698
<i>P. volitans</i>	α	2.519	699
	β	2.186	698
<i>P. antennata</i>	α	3.404	699
	β	2.817	698
<i>H. rubripinnis</i>	α	2.435	704
	β	2.464	700
<i>S. horrida</i>	α	2.377	703
	β	3.040	700
<i>S. verrucosa</i>	α	3.675	703
	β	3.510	700
<i>I. japonicus</i>	α	2.489	704
	β	2.566	700

3.8.4. Estrutura secundária em SpTx- α e SpTx- β e predição de sítios citolíticos

A predição de estruturas secundárias nas subunidades de SpTx foi realizada com o auxílio do servidor PSIPRED (UCL Department of Computer Science) e os dados obtidos comparados com a predição das estruturas secundárias obtidos para a toxina Stonustoxina (SNTX) de *Synanceia horrida*. Os resultados (Figura 41) revelaram que as subunidades α e β de *S. plumieri* contém cinco α -hélices com no mínimo 20 resíduos de aminoácidos (três na subunidade α – SpTx- α e duas na subunidade β – SpTx- β). As α -hélices preditas em SpTx- α ocorrem nos intervalos Gln-266 a Asp-292, Pro-299 a Ile-330 e Ile-354 a Lys-384, enquanto que em SpTx- β nas posições Thr-265 a Leu-289 e Ile-356 a Lys-386. Quando as α -hélices de SpTx foram comparadas com as identificadas em SNTX do gênero *Synanceia*, poucas diferenças em relação às posições das hélices foram observadas.

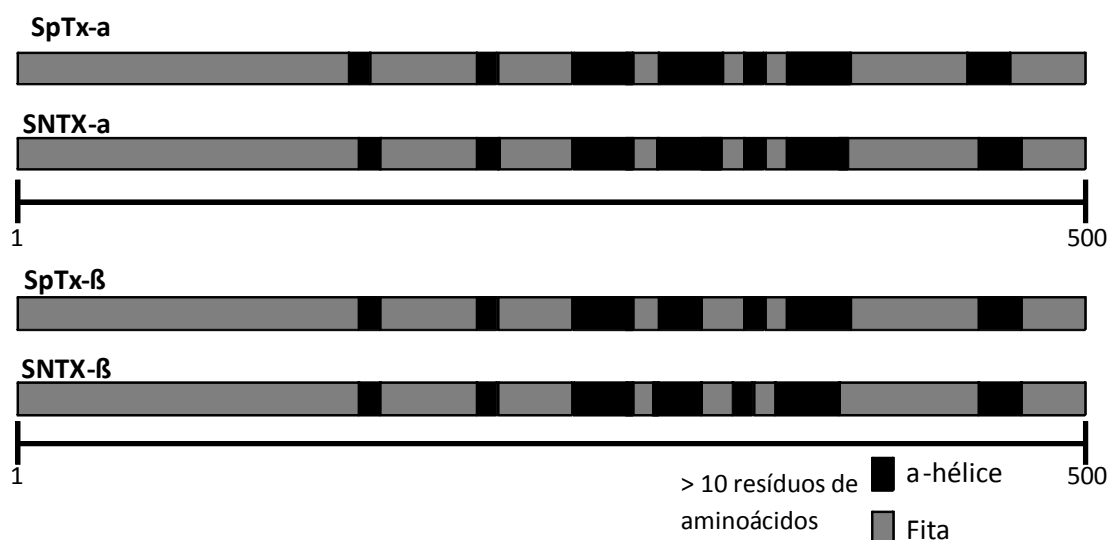
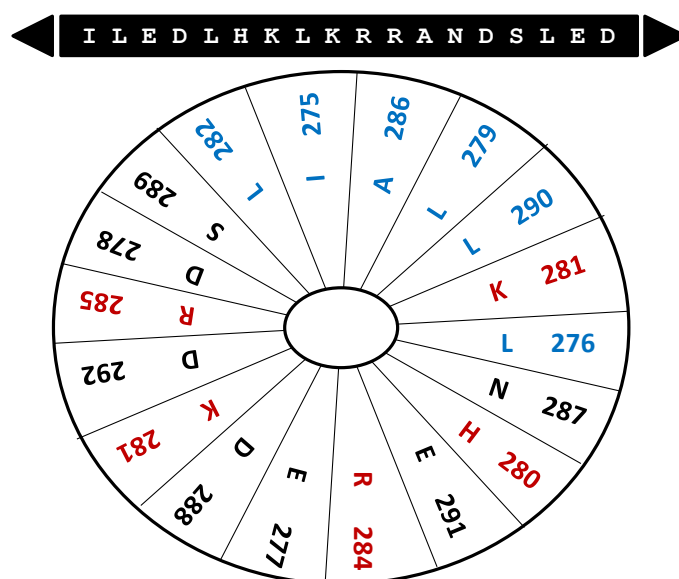


Figura 41: Representação esquemática de α -hélices preditas nas subunidades α e β de SpTx de *S. plumieri* e Stonustoxina (SNTX) de *S. horrida*. As predições foram realizadas pelo programa PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (UCL Department of Computer Science). **(A):** α -hélices preditas de SpTx- α e SNTX- α , respectivamente. **(B):** α -hélices preditas de SpTx- β e SNTX- β , respectivamente.

A predição de α -hélices na estrutura secundária de SpTx também foram realizadas através do diagrama de “Edmundson Wheel” (SCHIFFER; EDMUNDSON, 1967). Nesse programa, a anfipaticidade de uma α -hélice é determinada inserindo os resíduos num diagrama de roda helicoidal, o qual fornece uma visão superior da hélice, com as cadeias laterais dos resíduos projetadas em um plano perpendicular ao eixo longitudinal.

As análises revelaram que as α -hélices de SpTx são anfifílicas. Uma destas α -hélices pertencente à subunidade α localizada entre Gln-266 a Asp-292 é anfifílica para os 18 resíduos finais da hélice como ilustrado no diagrama da figura 42A. Como observado neste diagrama, os resíduos hidrofóbicos estão dispostos mais próximos entre eles e separados daqueles que apresentam caráter hidrofílico ou neutros. O N-terminal desta hélice é flanqueado por uma região que contém muitos resíduos básicos (Arg-270, Lys-271 e His-273), os quais provavelmente representam um motivo catiônico que é comum em muitas proteínas que possuem propriedades citolíticas. Uma segunda α -hélice (diagrama não demonstrado) foi também predita na subunidade α de SpTx (posição Pro-299 a Ile-330) e mostrou possuir potencial citolítico com N-terminal também flanqueado por resíduos básicos (Lys-303, Lys-304 e Lys-306).

A

Subunidade SpTx- α

B

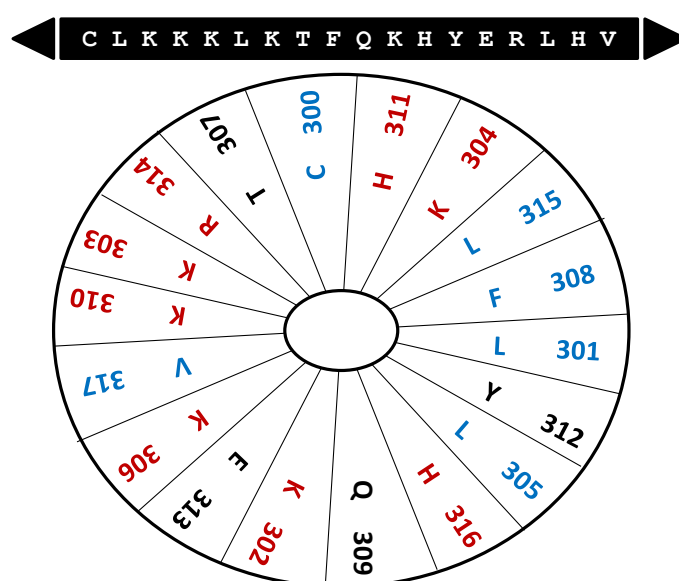
Subunidade SpTx- β

Figura 42: Predição de α -hélices nas subunidades α e β de *S. plumieri*. As predições foram realizadas pelo programa Helical Wheel (WHEEL) por “Schiffer-Edmundson” (SCHIFFER; EDMUNDSON, 1967). Aminoácidos hidrofóbicos estão em azul, os aminoácidos catiônicos (básicos) em vermelho e os aminoácidos hidrofílicos aniônicos (ácidos) ou neutros estão em preto. **(A):** α -hélice anfifílica predita de SpTx- α da Ile-275 até Asp-292. **(B):** α -hélice anfifílica predita de SpTx- β da Cys-300 até Val-317.

Em relação à SpTx- β , as hélices posicionadas entre Thr-265 a Leu-289 e Ile-356 a Lys-386 apesar de serem anfifílicas não foram consideradas como sítios de ação citolítica por não serem flanqueados com resíduos catiônicos. Apesar disso, após novas análises da estrutura secundária da subunidade β foi verificada uma α -hélice mais curta posicionada entre Cys-300 a Val-317. Aplicando o diagrama de “Edmundson Wheel” (SCHIFFER; EDMUNDSON, 1967) foi construído um modelo de α -hélice como ilustrado na figura 42B. Essa hélice revelou ser anfifílica, com resíduos hidrofóbicos na mesma superfície, enquanto que os resíduos hidrofílicos ou neutros posicionados em outro extremo. Além disso, mostrou possuir um potencial citolítico, uma vez que o N-terminal é flanqueado por resíduos básicos (Lys-302, Lys-303, Lys-304 e Lys-306).

Na tentativa de identificar regiões nas toxinas com potencial antimicrobiano, as sequências das subunidades de SpTx foram submetidas no servidor automatizado (AMPA). Os resultados (Figura 43A) revelaram a presença de 4 regiões na sequência de SpTx- α , nas seguintes posições: Asn-93 a Ala-119, Phe-319 a Arg-331, Trp-563 a Trp-578 e Ala-624 a Phe-636. Enquanto que, na sequência da subunidade SpTx- β foram identificadas 5 prováveis regiões nas posições: Lys-98 a Ala-111, Cys-300 a Leu-315, Val-567 a Val-581, Tyr-586 a Ser-603 e Ser-622 a Pro-640 (Figura 43B).

(A)

MSSDIIMAGLGRPFTLGLFLYDARREKLIPGFSLFGDETLOKYATSTPQHSSDFQIVASDSVESKSNVMDI
EASLGVSEFLGG LVEV GGS AKY L NNTKKYQNSRVTLQYKVTTFKQFKAPP GKVN VQQT AISDKNVATHV
VTAILFGANAFFVFDSDKVEDSN LQDIQ GKMEAVIK KIPSVSIEGSGSVQLTDEEKS LASNL SCKFHGDF
LLES LPTTFEEAVMTYQKLPELVGEEASDGVPMKVWLVLPLTRFYSKADLLVRDISQGLVRKVH SILEDLH
KLKRRANDSLED DTVKLEPLLEKKLKNFQKNYS DYM TTFRR TISQKLQSIRK GDEDETAMLQLFEDRLRS
PFNI DSNLMWMEITEREINVL RSCIDIIEETKHKAVLSQS QMVKDLLDSEVMH AVCYVFTY VTDKDH YLD
ALRDYLKSPNSRPARVRPVVTWVASNTVLETMREKAHLFRSLAKDMENRCVHFLVASI VNLKVEGA AIHY
YRESVLIEPNFKHPIISAVEKIVDRRDLWYDCELTLPNTSHPSLYLSEGNKKAVTGLT RAFDNNPERF
GLWQOVLCNKGLSRRHYWEVEWNGYVIVGVTYSSIGRKNIDIQSFIGFSETSWTLMFIPKNGVAVKGARR
SVSYFHLISDLA FFP LGLYH DCHASTLSFYKVS DNV LNH FHTIE IKPKLSEPVYAIIRIGDEDRPYHGTVR
LL

(B)

MPSDI L VVA ALGRPFTL GALYDARKDKLYPGFTLWEHEVLEE STVESDQPSST FEITASDS IDDKSSLMD
IEAS LKASFLGG LIEV GGS AKY LNDTK KFKNQSRVTLQYKATTSFKQLMTNLETKHVEYSEYFQNI EATH
VVIGILYGANAFFVFDSDKVDSSNVQDIQGSMEAVIKKIP SVEISGQGSVQLTSEESDITNSF SCKFHGD
FHLPSNPTTFEDAVKTYQQIPQMMGKETAVPMTVWLVPMTNFYSEAPQLMADSS TPILRKVRNTLEAMRQ
LDMRCNDSLERRHSEAGFHCLKKKLKT FQKH YERLHVNPFRKNHFPETFPSPGKGT KMKLQCLPTFRNKL
RSPSNINSLNMWMDCAEREINVL RSCIDIIEEAKHKV VLSKSQ MARELDDSEVKH AVCYVFTY VTDYDPF
LINALSDFS KSIKPKKYSPSKKDYWYTSDDVPEMMREKAHHFYNLAKDMENR CVRFLVASI VNPKEEGA I
HYYREGIQIINDFSNPRIPVETIQDQESYSGMTVSSPWKETAH PALHLSEGNKKAMSGKPQPSDNNPKR
FDHYQQVLCNKGLSKRHYWEVEWCGYVRAGITYKGIQRKTFASECSLGHTDMSWVFDYYPKSGYHHIYNN
KKVRVKVASPGFDR LGVYLDWPAGT LSFYMTSTWVTHLHTFSIRFNEAVYPAFLIGHGQKNANGQIKLK
GE

Figura 43: Predição de APs (Antimicrobial Peptides) nas subunidades α e β de *S. plumieri*. As predições foram realizadas com o uso do programa AMPA (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa>). Em verde estão mostrados as regiões preditas com potencial antimicrobiano, em cinza está mostrado α -hélices e em amarelo as folhas β preditas pelo programa PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (UCL Department of Computer Science). **(A):** Predições APs de SpTx- α ; **(B):** Predições APs de SpTx- β .

As sequências com propriedades putativamente antimicrobiana identificadas nas subunidades SpTx- α e SpTx- β foram pesquisadas em um banco de dados para peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP>).

Dos peptídeos detectados na subunidade α , três deles (SpTx α -AP1, SpTx α -AP2 e SpTx α -AP4) possuem quatro resíduos hidrofóbicos dispostos na mesma superfície. Uma análise da estrutura secundária destas regiões com o programa PSIPRED revelaram que somente SpTx α -AP2 forma α -hélice, enquanto que SpTx α -AP1 e SpTx α -AP4 contém folhas β . Em relação aos peptídeos detectados na subunidade β , somente o peptídeo SpTx β -AP2 forma α -hélice e é o único que contém no mínimo três resíduos hidrofóbicos dispostos na mesma superfície.

O alinhamento dos peptídeos SpTx α -APs e SpTx β -APs mostrado na figura 45 revelaram uma similaridade que variou de 32,25% a 44,44% (Tabela 25) com peptídeos antimicrobianos. Nesta tabela há também uma comparação da predição dos peptídeos alinhados com atividade antimicrobiana, a carga líquida total de cada peptídeo, a % de resíduos hidrofóbicos, além do índice de Boman, o qual indica o potencial de ligação às proteínas. Como é observado, a maioria dos peptídeos detectados nas duas subunidades mostraram similaridades e compartilham algumas características comuns com outros peptídeos antimicrobianos que possuem variável e amplo espectro de atividade demonstrada.

Tabela 25: Alinhamentos e características estruturais de peptídeos antimicrobianos nas subunidades SpTx- α e SpTx- β de *S. plumieri*.

ID	Nome/classe	Fonte	Atividade	Carga líquida	% resíduos hidrofóbicos	% similaridade*	índice Boman (kcal/mol)
Presente trabalho	SpTx α -AMP1	<i>S. plumieri</i>	-	+6	22	100	2,98
AP02062	Brevinin-1CG4	<i>A. chunganensis</i>	Gram +	+4	54	32,25	-0,15
AP02061	Brevinin-1CG3	<i>A. chunganensis</i>	Gram +	+3	54	32,25	-0,18
AP02059	Brevinin-1CG1	<i>A. chunganensis</i>	Gram +, fungi	+4	58	32,25	-0,24
Presente trabalho	SpTx α -AMP2	<i>S. plumieri</i>	-	+4	30	100	4,07
AP00695	Temporin-1TGa	<i>Rana tagoi</i>	Gram+, Gram-	+2	61	42,85	-2,33
AP00098	Temporin F	<i>Rana temporaria</i>	Gram+, Gram-	+2	61	40	-2,26
AP02369	VCT-VT2	<i>Vespa tropica</i>	Gram+, Gram-, Fungi	+1	54	40	-1,86
AP01938	Temporin-ALK	<i>A. loloensis</i>	Gram+, Gram-	+2	60	38,46	-1,67
Presente trabalho	SpTx α -AMP3	<i>S. plumieri</i>	-	+3	37	100	2,53
AP02238	NRC-18	<i>G. cynoglossus</i>	Gram -	+4	33	36,84	2,79
AP01900	Temporin-Rb	<i>Rana ridibunda</i>	Gram +, Gram -	+1	66	35,29	-1,0
Presente trabalho	SpTx α -AMP4	<i>S. plumieri</i>	-	+3	38	100	2,06
AP01266	Temporin-1TGb	<i>Rana tagoi</i>	Gram-	+2	62	41,17	-0,18
AP02218	Hp1090	<i>H.petersii</i>	Vírus	+2	61	33,33	-0,98
AP02216	VmCT1	<i>Vaejovis mexicanus</i>	Gram +, Gram -	+2	69	33,33	-1,16
Presente trabalho	SpTx β -AMP1	<i>S. plumieri</i>	-	+4	28	100	2,97
AP01814	PGLa-H	<i>Xenopus laevis</i>	Gram+, Gram-	+4	70	37,5	-0,75
Presente trabalho	SpTx β -AMP2	<i>S. plumieri</i>	-	+5	31	100	2,71
AP01158	RP-1 (synthetic)	platelet factor peptide	Gram-	+8	41	44,44	1,64
AP02393	P-10	<i>Ciona intestinalis</i>	Gram+, Gram-	+5	28	38,88	2,59
AP00143	L5K5W (synthetic)	de novo design	Gram+, Gram-	+6	54	37,5	0,07
Presente trabalho	SpTx β -AMP3	<i>S. plumieri</i>	-	+2	40	100	1,68
AP01541	Ocellatin-5	<i>L. ocellatus</i>	Gram+, Gram-	+1	52	39,13	0,15
Presente trabalho	SpTx β -AMP4	<i>S. plumieri</i>	-	+4	33	100	1,82
AP01939	Nigroain-B1	<i>R. nigrovittata</i>	Gram+, Gram-	+3	47	38,09	1,11
AP00398	Salmocidin 2B	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gram-	+2	30	36,84	0,74
Presente trabalho	SpTx β -AMP5	<i>S. plumieri</i>	-	+4	26	100	2,18
AP02011	Citropin 1.1.3	<i>Litoria citropa</i>	Gram+	+2	55	40,9	-0,75
AP00018	Aurein 2.5	<i>Litoria aurea</i>	Gram+, Gram-, fungi, câncer	+2	56	38,09	-0,89

*%: Se refere ao alinhamento com os peptídeos detectados nas subunidades de SpTx- α e SpTx- β .

Na busca, SpTx α -APs alinham com peptídeos descritos em secreções mucosas de anfíbios (Brevinin e Temporin), com peptídeos de glândulas de peçonhas relatados em vespas sociais e alguns aracnídeos, enquanto que SpTx β -APs alinhou especialmente com peptídeos descritos em secreções mucosas de anfíbios (PGLa-H, Ocellatin-5, Nigroain-B1, Citropin 1.1.3 e Aurein 2.5) e com peptídeos sintéticos (RP-1 e L5K5W). Apesar de SpTx α -AP3 e todos os peptídeos de SpTx- β com exceção do peptídeo SpTx β -AP2 não demonstrarem serem potenciais peptídeos antimicrobianos, todos eles mostraram a presença de resíduos conservados quando comparadas com peptídeos antimicrobianos (Figura 44).

(A) SpTx- α

SpTxα-AP1	-NNKKYQN-QS-RV-TIQYRVTTTFKQFKA
Brevinin-1CG4	FLST--LLNVASKVPTLFC--IT-K--KC
Brevinin-1CG3	FLST--LLNVASNVVPTLICK--IT-K--KC
Brevinin-1CG1	FLST--ALKVAANVPTLFC--IT-K--KC
SpTxα-AP2	ERRTISQKLOS-IR
Temporin-1TGa	-LP LG L G L
Temporin F	FLPLI-GKVLSCIL
VCT-VT2	F-LPIIGKILLS-
Temporin-ALk	F-FPIVVKILLS---
SpTxα-AP3	-WQQVLCKG--LSRREYW
NRC-18	GW-KKWFTKGERLSQRHFA
Temporin-Rb	FLPVL--AG-VLS-R-A
SpTxα-AP4	AV---KGARRSV-SYYF
Temporin-1TGb	AVDLAKIA-NKVLSSLE
Hp1090	IF---K-AIWSGIKSLF
VmCT1	----FL-GALWNVAKSVE

(B) SpTx- β

SpTxβ-AP1	K-FKNQSRVTIQYKA-
PGLa-H	KIAK---VAL-KAL
SpTxβ-AP2	CL-KK-KLRTFQKHYE-RI
RP-1 (synthetic)	ALYKKPK-KKLLKSLK-RI
P-10	VS-KI-K-KYL-KYKD-RI
L5K5W	---KK-LLK-WLK-KL-L
SpTxβ-AP3	-V---L--CNKC-LSKRHYW-V
Ocellatin-5	AVLDILKDVGKGLS-HFMEKV
SpTxβ-AP4	YV-RAGITYKGIQR-K-TFAS
Nigroain-B1	QVISAGWNHK-I-RCKLTGNC
Salmocidin 2B	----AGFVLKC-YT-K-TS-Q
SpTxβ-AP5	SG-YHHLYNNKKV-RV-KVASP
Citropin 1.1.3	-GLFDVI---KKVASVIGLASP
Aurein 2.5	-GLFD-I--VKKV-VGAFGSL-

Figura 44: Alinhamento de regiões identificadas nas subunidades α e β de Sp-Tx de *S. plumieri* com peptídeos antimicrobianos. O alinhamento dos peptídeos antimicrobianos foi gerado pelo banco de dados (<http://aps.unmc.edu/AP>). Em cinza estão mostrados os resíduos que são conservados em pelo menos dois ou três peptídeos. **(A):** SpTx α -APs (Antimicrobiano Peptídeo AP1 a AP4), AP02062 Brevinin-1CG4 de *A. chunganensis*, AP02061 Brevinin-1CG3 de *A. chunganensis*; AP02059 Brevinin-1CG1 de *A. chunganensis*; AP00695 Temporin-1TGa de *Rana*, AP00098 Temporin F de *Rana temporaria*, AP02369 VCT-VT2 de *Vespa tropica*; AP01938 Temporin-ALk de *A. loloensis*; AP02238 NRC-18 de *G. cynoglossus*; AP01900 Temporin-Rb de *Rana ridibunda*; AP01266 Temporin-1TGb de *Rana tagoi*; AP02218 Hp1090 de *H. petersii*; AP02216 VmCT1 de *Vaejovis mexicanus*. **(B):** SpTx β -APs (Antimicrobiano Peptídeo AP1 a AP5); AP01814 PGLa-H de *Xenopus laevis*; AP01158 RP-1 (synthetic) do platelet factor peptide; AP02393 P-10 de *Ciona intestinalis*; AP00143 L5K5W (synthetic) de novo design; AP01541 Ocellatin-5 de *L. ocellatus*; AP01939 Nigroain-B1 de *R. nigrovittata*; AP00398 Salmocidin 2B de *Oncorhynchus mykiss*; AP02011 Citropin 1.1.3 de *Litoria citropa*; AP00018 Aurein 2.5 de *Litoria aurea*.

3.8.5. Árvore filogenética das toxinas de Scorpaeniformes

Análises da filogenia molecular têm sido utilizadas para a obtenção de possíveis classificações evolucionárias de uma variedade de toxinas animais. As sequências de aminoácidos das subunidades α e β de *S. plumieri* foram combinadas com as sequências das subunidades de sete peixes Scorpaeniformes (GenBank) para a obtenção de um alinhamento múltiplo das toxinas (CLUSTALX 2.1). Baseado nesses resultados, uma árvore filogenética foi construída utilizando o programa TreeView (Figura 45).

De acordo com a árvore gerada, as toxinas Scorpaeniformes foram divididas em três grupos principais: 1) HrTx- β de *Hypodytes rubripinnis*, IjTx- β de *Inimicus japonicus*, SNTX- β de *Synanceia horrida* e NeoVTX- β de *Synanceia verrucosa*; 2) SpTx- β de *Scorpaena plumieri*, PvTx- α de *Pterois volitans*, PITx- α de *Pterois lunulata*, PaTx- α de *Pterois antennata*, PITx- β de *Pterois lunulata*, PvTx- β de *Pterois volitans* e PaTx- β de *Pterois antennata*; 3) SpTx- α de *Scorpaena plumieri*, HrTx- α de *Hypodytes rubripinnis*, SNTX- α de *Synanceia horrida*, NeoVTX- α de *Synanceia verrucosa* e IjTx- α de *Inimicus japonicus*.

A análise filogenética do primeiro grupo formado pelas subunidades β dos gêneros *Hypodytes*, *Inimicus* e *Synanceia* coincide com a alta identidade nas sequências de aminoácidos entre essas toxinas que variaram entre 83-95%, sendo maior entre as espécies do mesmo gênero, como é o caso de *Synanceia*.

O segundo grupo contém SpTx- β e todas as subunidades α e β do gênero *Pterois*. Nesse caso, as toxinas de *Pterois* estão nas posições da árvore de acordo com a identidade verificada entre as subunidades que variou entre 81-99%, sendo maior entre as mesmas subunidades de diferentes espécies, como mostrado na tabela 22. A subunidade SpTx- β também mostrou alta identidade que variou entre 67-74% com as subunidades de *Pterois*, entretanto também foi verificada uma alta identidade (68-69%) com as subunidades β de *Hypodytes*, *Inimicus* e *Synanceia*, confirmando a posição de SpTx- β entre essas subunidades na árvore filogenética. Por fim, o terceiro grupo formado por SpTx- α e as subunidades α de *Hypodytes*, *Synanceia* e *Inimicus* difere dos demais, uma vez que, nesse caso SpTx- α apresentou identidade com pouca variação (53-58%) quando todas as subunidades foram analisadas e comparadas.

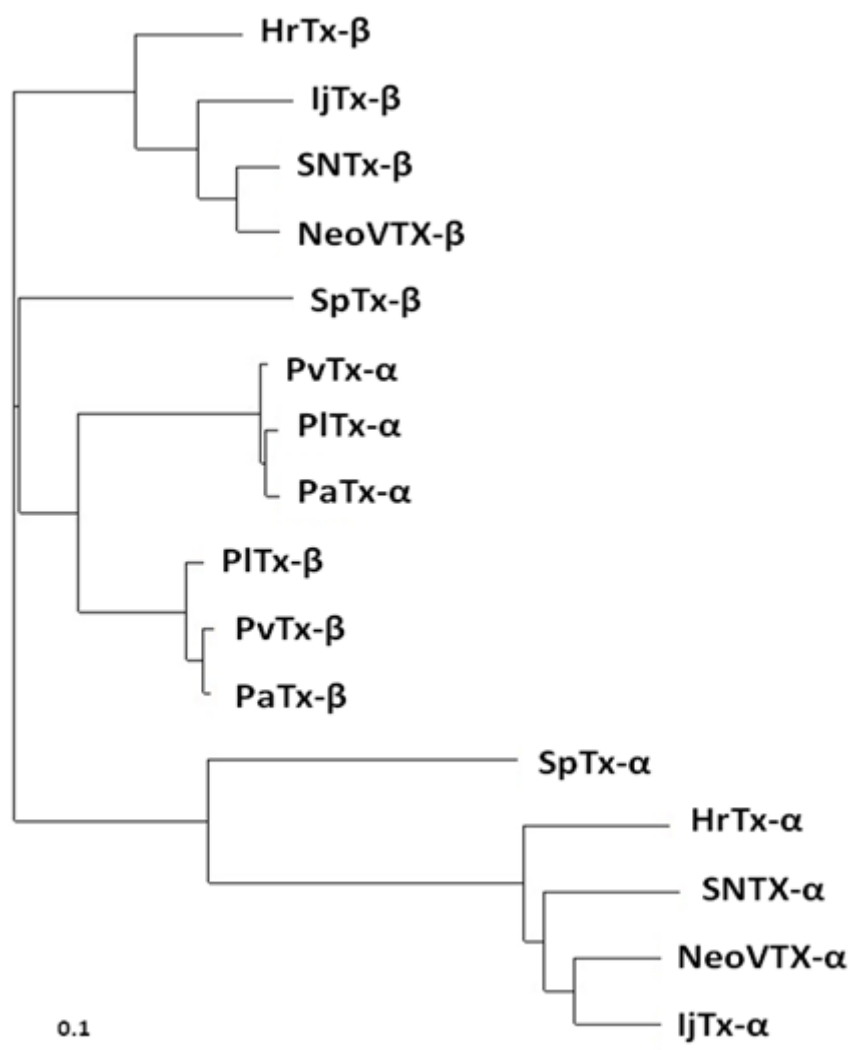


Figura 45: Árvore filogenética das toxinas de peixes Scorpaeiformes. A árvore foi gerada pelo algoritmo ClustalX 2.1 (THOMPSON et al., 1994) combinado com o programa TreeView (PAGE 1996) e construída pelo método Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância genética de 0.1 como a frequência de substituições em comparações aos pares entre duas sequências. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank): α- e β-subunidades: PI-Tx de *Pterois lunulata*, AB775453 e AB775454; Pv-Tx de *Pterois volitans*, AB623222 e AB623223; Pa-Tx de *Pterois antennata*, AB623220 e AB623221; Ij-Tx de *Inimicus japonicus*, AB775455 e AB775456; Hr-Tx de *Hypodytes rubripinnis*, AB775457 e AB775458; NeoVTX de *Synanceia verrucosa*, AB262392 e AB262393; SNTX de *Synanceia horrida*, U36237 e U32516.

4.0. Discussão

Devido à diversidade de efeitos da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri* e a falta de informações sobre esses venenos, a proposta desse trabalho foi objetivada para estudar a diversidade molecular do aparato peçonhento desses peixes.

O passo básico na construção de uma biblioteca de cDNAs é o processo de gerar uma cópia de DNA dupla-fita a partir de um mRNA. Então, o principal fator que afeta a qualidade de uma biblioteca de cDNAs é a qualidade do mensageiro. Particularmente, para gerar cDNAs completos são necessários moléculas de mRNA intactas, o que torna essencial iniciar o projeto com a mais alta qualidade de RNA possível (AUSUBEL, 1995; SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Então, para assegurar a obtenção de moléculas de RNA íntegras, característica fundamental para a construção de uma biblioteca de cDNA representativa, foram tomadas todas as precauções para evitar a contaminação das preparações com presença de RNases.

A literatura mostra que uma biblioteca ideal, avaliada a partir de 100-200 sequências, não deve conter mais de 50% de sequências exatamente homólogas com genes do organismo em estudo, devem conter transcritos distintos, devem conter uma baixa porcentagem de clones sem insertos ou correspondentes a DNA mitocondrial ou espécies de RNA ribossomal e também nenhuma evidência de contaminação com sequências de outros organismos (ADAMS et al., 1995).

Para a síntese do cDNA e construção da biblioteca, foi preparado inicialmente o RNA total do aparato peçonhento (espinhos dorsais e pélvicos) de *S. plumieri*, utilizando um protocolo convencional de lise celular com solução desnaturante 4 M de isotiocianato de guanidina e extração com fenol: clorofórmio (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). Esse protocolo mostrou ser eficiente na produção de moléculas não degradadas e com rendimento suficiente para os experimentos.

A integridade das moléculas extraídas foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose e observou-se a presença de duas bandas íntegras correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S (Figura 8A), características que são comuns na migração eletroforética de RNAs totais de outros eucariotos (MARTIN et al., 2001). Em geral, 1 g de tecido gerou 0,1 mg de RNA total (Tabela 5), esse rendimento foi baixo

quando comparado com RNAs de outras fontes, como de tecidos musculares ou do fígado, em que 0,1-0,5 mg de RNA total são obtidos a partir de 100 mg de tecido utilizando a mesma técnica de extração (AUSUBEL, 1995) entretanto a quantidade de RNA foi aceitável visto que o aparato peçonhento de peixes não constitui um tecido com síntese proteica intensa e contínua (HALSTEAD, 1988).

Os resultados demonstraram que as moléculas isoladas de RNAs a partir dos espinhos de *S. plumieri* estavam livres de nucleases e em quantidades apropriadas para a construção da biblioteca e caracterização de cDNAs. O perfil inalterado de distribuição de RNAs após 2 h de incubação à 37°C observado na figura 8B sugere a ausência de nucleases na preparação, o qual é essencial para os subsequentes passos para a clonagem.

O método de isolamento forneceu uma quantidade suficiente de RNA total (0,1 mg/g tecido) para a purificação de mRNA poli (A)⁺ através “Messenger RNA Isolation Kit” (Stratagene). A purificação do mRNA a partir do RNA total foi realizada por cromatografia em coluna de oligo (dT) celulose e a quantificação deste feita em espectrofotômetro [®]NanoDropND-1000. As amostras de mRNA (Tabela 5) foram obtidas com bom grau de pureza como julgado pela razão 260/280 e a recuperação foi em torno de 4 µg de mRNA a partir de 100 µg de RNA total (~ 4%). Esse rendimento foi esperado, uma vez que as espécies de mRNAs podem corresponder a até 5% do total de RNAs citoplasmáticos. É possível que nesse rendimento se incluam RNAs, que não foram eficientemente retidos pela resina, uma explicação para esse fato pode ser devido ao tempo de uso já ultrapassado do estoque de resina oligo (dT) celulose disponibilizada para os experimentos, o que pode justificar o fato de encontrarmos uma porcentagem não desprezível de contaminação com moléculas de RNA clonadas.

Para iniciar a síntese das duas fitas de cDNAs durante a construção da biblioteca, foram utilizados 5 µg de RNA após purificação em oligo (dT) celulose, precipitação e lavagem dos sedimentos em etanol 75%. Após a síntese, o cDNA total obtido foi purificado em gel filtração Sepharose CL-2B (Figura 9) com o intuito de selecionar os cDNAs pelo tamanho e eliminar nucleotídeos não incorporados durante as reações. A seleção por tamanho foi então realizada, uma vez que esse procedimento é particularmente útil na construção de bibliotecas informativas, desde que é mais provável a ocorrência de sequências codificadoras de proteínas intactas a

partir de sequências maiores que 500 bp. Portanto, isso pode favorecer a seleção de certos tipos de transcritos (médio e grande tamanhos) em detrimento de transcritos menores. A seleção por tamanho é particularmente importante, como no caso das bibliotecas de glândulas de serpentes, em que os tecidos produzem uma grande quantidade de proteínas (ZHANG et al., 2006; JIA et al., 2008).

A biblioteca de cDNAs foi gerada em um sistema de alta eficiência com clonagem em fagos λ (Stratagene, Agilent Technologies, Inc. 2008). A ligação do vetor Uni-ZAP XR foi realizada com aproximadamente 375 ng de cDNAs selecionados e o produto final foi empacotado em partículas de fagos viáveis Gigapack III Gold Cloning. Essa estratégia escolhida para a construção da biblioteca foi devido ao fato do sistema de vetor Uni-ZAP XR combinar uma alta eficiência na construção de uma biblioteca utilizando os braços dos fagos lambda e a conveniência de ser analisada em sistema plasmidial com seleção de cor azul/branco, após a excisão *“in vivo”* do fagemídeo pBluescript, além disso, o fagemídeo possui 6 sítios diferentes para o sequenciamento do DNA e que a biblioteca pode ser selecionada com anticorpos ou sondas radioativas.

A biblioteca primária apresentou um título total de 185 mil e quando a biblioteca foi analisada para identificar a presença da β -galactosidase com IPTG e X-gal, aproximadamente 90% dos bacteriófagos foram recombinantes (placas claras), um valor que representa quase a totalidade da biblioteca (Tabela 6).

Para caracterizar inicialmente a biblioteca, foram realizados sequenciamentos parciais aleatórios para obtenção de ESTs. Essa abordagem proporciona um método de triagem rápido e confiável para a descoberta de genes, bem como uma fonte de novas anotações para a análise de transcritos expressos conhecidos e desconhecidos (ADAMS et al., 1995), embora recentemente novas tecnologias de sequenciamentos de nova geração têm substituído os métodos clássicos de sequenciamentos de DNAs por Sanger (1977).

As novas tecnologias de sequenciamento estão redefinindo o campo de pesquisa nos estudos da biologia do genoma e transcriptoma (PETTERSSON et al., 2009; METZKER, 2010), as plataformas mais recentes de sequenciamento de próxima geração, como a Illumina HiSeq e SOLiD4 Life Technologies são capazes de gerar mais de 100 gb por corrida (BORGSTROM et al, 2011), bem como as técnicas de

pirosequenciamento 454 Life Sciences capazes de gerar aproximadamente 500 milhões de bases em poucas horas (PETTERSSON et al., 2009).

Nesse trabalho inicial para caracterizar a biblioteca, foram sequenciados randomicamente pelo método tradicional de Sanger (1977) 470 clones contendo insertos. As sequências contendo genes de *E. coli*, RNA ribossomal e de baixa qualidade totalizaram aproximadamente 25% dos clones, sendo as restantes 356 ESTs consideradas de boa qualidade e apropriadas para anotação. Muitos destes compartilham similaridade com sequências previamente descritas encontrados em peixes de outras espécies e a maioria dos insertos, quase 70%, tinham extensão de tamanho maior ou igual a 0.5 kb (Figura 12).

O gráfico em forma de pizza da figura 13 mostra que 30% das ESTs corresponderam a sequências desconhecidas, seguido de quantidades semelhantes de proteínas hipotéticas ou relacionadas aos processos metabólicos (17%) e sequências sinalizatórias (14%). A grande proporção de ESTs com funções desconhecidas sugere a presença de novas proteínas ainda não catalogadas e cujas funções ainda não foram definidas. De modo semelhante em um trabalho de análises de ESTs do transcriptoma de sequências expressas da glândula de peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim) foi também descrito uma quantidade expressiva de sequências desconhecidas (39%), sugerindo a existência de proteínas ainda não-identificadas em compartimentos glandulares de espécies marinhas (MAGALHÃES et al., 2006).

Durante o screening randômico, 115 ESTs foram selecionadas para demonstrar a representatividade da biblioteca de *S. plumieri* (Tabela 7). Destes, valem ressaltar uma sequência que alinhou com proteínas envolvidas no transporte de colesterol, um precursor de apolipoproteína E e a presença de genes relacionados a sinalização celular, como as integrinas.

Proteínas envolvidas na ligação ao Ca^{2+} incluindo uma sequência putativa para S-100 e outra para anexina 1A também foram detectadas. Proteínas S-100 têm sido identificadas em glândulas exócrinas e possuem funções importantes durante a secreção (CASE et al., 1988). Estas proteínas juntamente com anexina 1A podem formar heterocomplexos devido ao aumento de Ca^{2+} intracelular, estimulando a secreção de peçonha. Portanto, a presença desses transcritos na biblioteca de *S.*

plumieri sugere que esses genes provavelmente estão envolvidos na secreção de toxinas do aparato peçonhento.

Os sequenciamentos de ESTs revelaram transcritos que alinharam com sequências de DNA de peixes responsáveis por proteger proteínas da degradação e necessárias durante o processamento pós-traducional (Hsp70, Hsp90 e uma subunidade de chaperonina). Proteínas de choque térmico e outras chaperoninas pertencem a um subgrupo ubíquo de proteínas que atuam diretamente no enovelamento e montagem de proteínas celulares (WELCH, 1991). Alguns trabalhos mostram que os níveis de Hsps aumentam nos tecidos de peixes em resposta a uma variedade de agentes estressores ambientais e biológicos (IWAMA et al., 1999).

Interessantemente, foram também encontrados genes envolvidos na hemostasia, como: fibronectina-like, angiopoietina e fator Von Willebrand, assim como genes envolvidos nas respostas imunes, como: a cadeia pesada de imunoglobulina, timosina, coronina-1A-like e IRF-1, um fator transcricional que possui um papel crítico nas defesas antivirais e imunes (SHI et al., 2010). ESTs que mostraram homologia com genes relacionados a imunidade inata, tais como a ferritina, thrombospondina e lectinas de ovo de peixes foram também identificadas na biblioteca (ELLIS, 2001; GANZ, 2009).

Lectinas são pouco descritas em animais marinhos, particularmente em peixes. Elas são encontradas preferencialmente no plasma, superfícies mucosas e ovos de peixes (ARASU et al., 2013). Na biblioteca, lectinas de ovos de peixes (ou fish egg lectin) foram altamente abundantes nas glândulas de peçonha de *S. plumieri* e já foi relatado que essas moléculas podem contribuir com o envenenamento, como por exemplo, a lectina quimo-atraente, nomeada karatoxina isolada dos espinhos dorsais do peixe-escorpião redfin velvetfish *Hypodytes rubripinnis*, já que a glicoproteína é capaz de induzir aglutinação de eritrócitos de coelhos (SHINOHARA et al., 2010).

Lectinas são proteínas aglutinantes que reconhecem glicoproteínas e glicoconjugados específicos na superfície celular. Em um recente estudo, uma lectina-like nomeada plumieribetina foi descrita nas glândulas de peçonha de *S. plumieri* (EVANGELISTA et al., 2009). Essa lectina foi capaz de inibir a ligação de integrinas ao colágeno IV da membrana basal, contribuindo dessa forma com os efeitos farmacológicos provocados por envenenamentos por peixes-escorpião.

Plumieribetina é uma proteína homodimérica, estruturalmente possui alto conteúdo de folhas β antiparalelas similar às B-lectinas ligantes de manose, caracterizadas em monocotiledôneas. Plumieribetina não é glicosilada e não possui motivos O-glicanos, modificações que são necessárias para a ligação às integrinas, portanto, foi proposto que plumieribetina liga diretamente com as moléculas das membranas. A proteína já caracterizada (14.4 kDa) atua como inibidor de integrina $\alpha 1\beta 1$ semelhante às B-lectinas de plantas e à puflectina encontrada na pele e intestino do peixe pufferfish/*Fugu* (*Takifugu rubripes*) (TSUTSUI et al., 2003).

O screenig da biblioteca com anticorpos contra frações de lectina e peçonha total (Figura 17) permitiu a identificação de vários clones (11%) que tiveram homologia com lectinas de ovos de *Oplegnatthus fasciatus*, *Dicentrarchus labrax*, *Maylandia zebra* e *Oreochromis niloticus* (Figura 18).

Análises das sequências consenso deduzidas dessa lectina-like encontrada na biblioteca permitiram a identificação de uma ORF com 267 resíduos contendo três resíduos de Cys conservados em lectinas de outros peixes e apresentou tamanho compatível com plumieribetina. O alinhamento desta lectina-like revela alguns resíduos de aminoácidos invariantes (Asp-81 e Asn-125) presentes na estrutura do domínio em forma de cúpula, comum em todas as lectinas de leguminosas sequenciadas até o momento (Asp-207 e Asn-253, neste trabalho) e responsáveis pelo reconhecimento de açúcares.

Durante as análises “*in silico*” (Expasy, BLAST e UniProt) da sequência consenso dessa lectina se identificou a presença de uma região β -propeller encontrado também na tachylectina-2, descrito no caranguejo *Tachypleus tridentatus* (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997). Uma inspeção na sequência consenso de sítios potencialmente modificados mostra ausência de sítios de glicosilação, um sítio de N-acetilação e seis sítios potenciais de glicação em Lys. Predições da estrutura secundária com auxílio do Expasy (SOPMA) sugerem a prevalência de folhas β em tandem (41%), seguido por enovelamentos aleatórios (39%) e α -hélices (9%). A presença de folhas β em tandem têm sido frequentemente relatadas em lectinas ligantes de manose isoladas de plantas (BARRE et al., 2001). Portanto, é possível que lectinas de peixes contribuam com os efeitos farmacológicos observados para outras lectinas, tais como severa dor, inchaço e febre (SHINOHARA et al, 2010).

Em adição às lectinas de ovos de peixes encontradas utilizando screening com anticorpos também foram identificadas outras lectinas que alinharam com lily-lectinas (6%). Análises do consenso da proteína putativa da lectina de *S. plumieri* mostraram homologia com lectinas do tipo lily de *Platycephalus indicus*, *Epinephelus coioides*, *Haplochromis burtoni* e *Oplegnathus fasciatus* (Figura 19). Esta lectina denominada SpLTL-1 parece interagir especificamente com D-manose, como a puffedlectina descrita por Tsutsui e colaboradores, 2003 e isolada do muco da pele e intestino de *Takifugu rubripes*, com a qual compartilhou uma identidade de 58%. Além disso, SpLTL-1 mostrou 40% de identidade com lectinas ligantes de manose presentes em plantas monocotiledôneas incluindo *Allium ascalonicum* e *Allium cepa*.

SpLTL-1 possui três motivos conservados ligantes de manose (QxDxNxVxY) semelhantes ao que ocorre com outras lectinas do tipo lily (TSUTSUI et al., 2003; ARASU et al., 2013), lectinas de muco da pele (SUZUKI et al., 2003; TSUTSUI et al., 2006b), lectinas de muco do intestino (TSUTSUI et al., 2005; TSUTSUI et al., 2006a) e lectinas de monocotiledôneas (SMEETS et al., 1997). Motivos formados entre as folhas β parecem estar envolvidos no reconhecimento específico de α -D-manose, induzindo uma variedade de processos biológicos, tais como interações célula-célula, entre hospedeiros e patógenos, além da participação em respostas imunes inatas (ARASU et al., 2013).

Lectinas ligantes de manose (MBL) também são encontradas no soro de muitas espécies de pássaros e mamíferos, e nesse caso são responsáveis por ativarem o sistema complemento via lectina (TURNER, 1996; LEURSEN et al., 1998). Em adição, cDNAs que codificam lectinas homólogas foram detectados e descritos nos peixes ósseos da família Cyprinidae (VITVED et al., 2000) e estas lectinas provaram ser ligantes de manose e participam na ativação do sistema complemento mediado por lectinas (NAKAO; YANO, 1998).

Uma árvore filogenética foi construída utilizando a sequência completa de aminoácidos de SpLTL-1 com outras sequências de lectinas de peixes e as análises revelaram que SpLTL-1 possui alta similaridade com a lectina do tipo lily do peixe Scorpaeniforme *Platycephalus indicus*, indicando que SpLTL-1 provavelmente é uma nova lectina do tipo lily. As relações evolucionárias observadas na árvore filogenética da figura 20 estão de acordo com a classificação taxonômica destes peixes.

A presença de SpLTL-1 nas glândulas de peçonha sugerem que essas proteínas provavelmente oferecem uma resposta inicial contra a invasão de microorganismos marinhos patogênicos. Similarmente, o mRNA para puflectina foi largamente expresso em tecidos externos como guelras, parede da cavidade oral e pele (TSUTSUI et al., 2003).

Com a intenção de obter clones específicos da biblioteca, após a seleção com anticorpos primários produzidos a partir de uma fração de lectina ou com a fração total de *S. plumieri* (GOMES et al., 2013), os clones identificados com as duas frações de anticorpos foram agrupados compondo um total de 90 ESTs com boa qualidade (Figura 17), 51,1% deles tiveram tamanho igual ou superior a 500 bp (Figura 16). Similarmente ao screening randômico foram encontradas proporções parecidas de ESTs com funções desconhecidas em banco de dados e também esse método de triagem produziu uma baixa proporção de proteínas relacionadas à síntese proteica e processamento. Ao contrário do screening randômico, foram caracterizadas muitas ESTs classificadas como proteínas regulatórias e sinalizatórias, sendo estas a maioria (17%) formada por lectinas, o que valida o uso dos anticorpos contra uma fração de lectina como abordagem de seleção.

A tabela 8 mostra uma lista das ESTs representativos obtidos após screening com anticorpos. Em adição as proteínas de ligação ao Ca^{2+} já relatadas anteriormente, foram detectadas anexina A5. A função da proteína anexina A5 é desconhecida, embora tenha sido proposto que possui um papel importante na coagulação por competir com a fosfatidilserina nos sítios de ligação da protrombina. Além disso, experimentos “*in vitro*” demonstraram que anexina A5 inibe atividades fosfolipases A_2 (PIGAULT et al., 1994). Em outros trabalhos, foi relatado que anexina A5 é efetiva na estabilização da morfologia celular durante processos como endocitose e exocitose, assim como outros processos relacionados com as membranas celulares (DONNELLY; MOSS, 1997). Outras proteínas dependentes de cálcio foram também identificadas e incluídas na categoria de regulatórias, tais como calpaína e calcitonina.

Em relação às proteínas relacionadas ao transporte de moléculas, foram detectadas três ESTs que codificam para lipocalinas, uma família de proteínas responsáveis pelo transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas como esteróides, bile, retinóides e lipídeos (FLOWER et al., 1993). Outras ESTs identificadas no screening

com anticorpos foram alinhadas com proteínas relacionadas aos hormônios, como gonatropina, receptor de ácido retinóico, além da calcitonina já relatada anteriormente.

Até o momento, utilizando vários critérios de screening foram sequenciadas um total de 942 ESTs. Segundo Adams e colaboradores (1995), bibliotecas para uso em projetos de sequenciamento de cDNA em larga escala devem passar por rígidos critérios de controle de qualidade. Para a avaliação da qualidade da biblioteca esses autores sugeriram 17 parâmetros diferentes a serem considerados.

Nesse trabalho, para a biblioteca de *S. plumieri* foram avaliados 12 desses parâmetros (Figura 21). Os 5 parâmetros adicionais não avaliados aqui se referem à mensuramentos da diversidade de genes quando são comparados mais de uma biblioteca do mesmo organismo construídas em situações diferentes.

Segundo esses autores, para justificar o screening em larga-escala, uma biblioteca deve conter não mais do que 20% de clones sem insertos, rRNA e DNAm_t (parâmetros 2, 4 e 5), nenhuma sequência contaminante de outro organismo (parâmetro 3) e pelo menos 50% de novos genes (parâmetro 11). Na biblioteca de *S. plumieri*, apesar da realização da purificação dos cDNAs antes da ligação com o vetor, esta ainda demonstrou conter clones sem insertos, em pelo menos 5,2% do total de ESTs sequenciadas e a soma dos parâmetros 2, 4 e 5 ficou um pouco superior a 20%, totalizando 31,4%.

Foi avaliada a redundância presente na biblioteca, isto é, a frequência com que um mesmo gene foi selecionado da biblioteca ao acaso. A redundância fornece informações úteis a respeito da qualidade da biblioteca (Figura 22). Os genes mais frequentes e redundantes foram os que codificam para lectinas de ovos de peixes (25,7% do total de clones representativos). Essa redundância já era esperada, uma vez que o mRNA foi purificado a partir de espinhos dorsais dos peixes jovens e nestes tecidos são relatados como uma fonte potencial de lectinas (ARASU et al., 2013).

A elevada redundância de alguns clones, pode ser atribuída à preferência na transcrição reversa de alguns mRNAs ou ao alto nível de expressão destes genes, visto que se trata de uma glândula especializada e provavelmente produz mensageiros específicos (PAINE et al., 1992). Além disso, o fato dos cDNAs terem sido selecionados por tamanho e a biblioteca ter sido submetida à uma etapa de purificação para a

retirada de clones sem insertos e nucleotídeos não-incorporados, podem ter contribuído para a exclusão de transcritos menos abundantes.

Um processo de pré-screening seria útil para a eliminação de clones correspondentes aos transcritos mais frequentes, através de métodos de hibridização com um conjunto de sondas dos insertos dos clones mais frequentes. Essa estratégia pode ser adequada para a identificação e remoção de cDNAs abundantemente expressos, assim como de clones não informativos, como por exemplo, aqueles que contém rRNA ou DNA mitocondrial, na tentativa de maximizar o número de cDNAs correspondentes a transcritos raros. Hibridizações subtrativas entre duas bibliotecas são utilizadas com o objetivo de remover seletivamente sequências compartilhadas por duas bibliotecas e aumentar o número de clones contendo sequências específicas de uma delas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A biblioteca de cDNAs contendo 942 ESTs foi clusterizada em 506 unives (40 contigs e 466 singlets). Os clusters putativos (Tabela 11) melhor representados na biblioteca foram os relacionados com funções de síntese de proteínas e processamento (28), refletindo a importância desta função para as glândulas e também aquelas com funções relacionadas à homeostasia e ao sistema imune (31). Destes, 10 clusters foram formados com 60 ESTs e codificam sequências que alinham com lectinas de ovos de peixes, obtendo uma relação de 6 ESTs lectinas/cluster.

Uma comparação na distribuição dos clusters com a análise inicial das ESTs no banco de dados BLASTn revelou diferenças significativas nas categorias (Tabela 11). Durante a análise das ESTs com BLASTn foram identificadas 39 (7%) ESTs formadas por sequências envolvidas na síntese de proteínas e processamento e representou 19,6% dos clusters, 80 (14%) ESTs para o metabolismo constituíram 16 clusters totalizando 11,2%, 46 (8%) para genes estruturais/motilidade formaram 23 clusters (16%), 103 (18%) envolvidos com a sinalização celular foram clusterizados em dois grupos, sendo: 19 clusters (13,3%) no grupo sinalização celular e 31 clusters (21,7%) para genes relacionados com a homeostasia e defesa imune, das 62 (11%) ESTs que codificam para proteínas regulatórias, 12 delas foram incluídas na categoria anterior referente à homeostasia e defesa imune e as restantes formaram 15 clusters (10,5%), 81 (14%) de proteínas hipotéticas formaram 11 clusters (7,7%) e, por fim, 162 (28%) ESTs com funções desconhecidas formaram 135 clusters (Figura 23).

Após o agrupamento da biblioteca em clusters, foi observado que 28% dos clusters alinharam com sequências de proteínas conhecidas no banco de dados, além disso, foi verificado que um menor número de sequências foi reconhecida na base Kegg Orthology, indicando que há vários genes com funções novas não contempladas nas bases de dados (Tabela 15). Em contrapartida, foi verificada uma lista de ESTs (Tabela 14) que alinharam com sequências encontradas em banco de dados BLASTn não-redundante, mas que não foram contempladas nas bases GO e KO utilizadas durante a clusterização.

O programa BLAST2GO realiza a anotação de sequências em relação à função e localização de um produto gênico com os índices do GO. Os clusters obtidos foram anotados e mapeados para a geração de identificadores pelo GO e gráficos combinados foram construídos para as três categorias (processos biológicos, componente celular e função molecular). Como observado na figura 25, em relação aos processos biológicos, três categorias foram mais representadas: processos celulares (20%), processos metabólicos (16,4%) e processos únicos (11,9%). Interessante notar que a categoria derivada da “resposta ao estímulo” contou com 6,1%, provavelmente relacionadas com o habitat do animal e com as funções de defesa e predação próprias das glândulas de peçonha. Em relação aos componentes celulares, os principais identificadores foram os extracelulares, principalmente relacionados aos processos membranosos (quase 30%), o que corrobora com a atividade secretora das glândulas de peçonha. Por fim, em relação às funções moleculares, as categorias predominantes foram as atividades de ligação (40,7%), catalíticas (22,2%), seguido das funções estruturais (21,4%).

A presença de muitos clusters relacionados à síntese de proteínas e especialmente aqueles relacionados aos processos energéticos próprios das mitocôndrias são também relatados em outras bibliotecas construídas a partir de glândulas de peçonha de serpentes (NEIVA et al., 2009), aracnídeos (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008), escorpiões (ALVARENGA, 2013) e de peixes (MAGALHÃES et al., 2006). De acordo com Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002), esses resultados são esperados para tecidos especializados, em que sua principal função está relacionada à produção e secreção de proteínas tóxicas pelo lúmen das glândulas de peçonha.

A identificação de clones que codificam as subunidades α e β de *S. plumieri* teve por finalidade a caracterização completa do mRNA dessas toxinas e a identificação de genes visando a futura expressão deles como proteínas de fusão. Para atingir esses objetivos, foram realizados os métodos de screening da biblioteca baseado em PCR e com sondas radioativas para identificar as subunidades α e β diretamente da biblioteca de bacteriófagos. Quando foram realizadas reações de PCRs com os primers desenhados a partir de cDNAs das toxinas dos peixes Scorpaeniformes (Figura 26), quatro amplicons foram obtidos (Figura 27), três dos quais foram igualmente identificados utilizando o screening direto dos cDNAs (Figura 29), são eles: um produto que codifica uma região da proteína titina, uma sequência com função hipotética e um fragmento de β -actina (Tabela 18). De modo diferente ao screening das toxinas utilizando cDNAs, o quarto amplicon foi identificado diretamente da biblioteca de bacteriófagos e codifica 74% da proteína madura da subunidade β de *S. plumieri*.

Para avançar na caracterização de algum dos fragmentos clonados da toxina putativa, foram realizados experimentos de expressão heteróloga em *E. coli* do fragmento de 1.551 bp referente à subunidade β de *S. plumieri*. Os resultados preliminares mostram a expressão de uma proteína sob efeito do indutor L(+)-arabinose com massa estimada de 45 kDa (Figura 28), um pouco menor do valor teórico baseado no tamanho do fragmento de DNA (56.8 kDa). A diminuição no tamanho real da proteína foi também observada quando as subunidades α e β da SNTX foram expressas em *E. coli* (GHADESSY et al., 1996). Em adição, a expressão nas condições utilizadas parece ser mais eficiente em tempos menores (4 h) se comparado após indução com tempos maiores (12 h).

Ensaio de Western blotting da proteína recombinante utilizando anticorpos contra a peçonha total de *S. plumieri* não foram eficientes na confirmação da identidade das proteínas expressas. Futuros estudos estão encaminhando para estabelecer se as proteínas expressas correspondem às toxinas e se os fragmentos de cDNAs podem elucidar respostas imunológicas.

O screening das toxinas de *S. plumieri* foi exaustivo, tanto na biblioteca como diretamente dos cDNAs. Apesar das várias combinações de primers utilizadas nas reações de PCRs não detectarem fragmentos putativos para toxinas, as análises de

algumas sequências mostraram alinhamentos com genes descritos em peixes (Tabela 19), confirmando que as populações de cDNAs do nosso material representam a entidade modelo do estudo.

Dos amplicons isolados por PCRs do cDNA é preciso ressaltar que novamente genes relacionados ao sistema imune foram identificados (IRF-1, Figura 31) e um domínio de titina imunoglobulina (Ig)-like (Titina, Figura 32) que fazem parte de proteínas musculares com função biomecânica, responsáveis por estabelecer e manter a integridade estrutural e elasticidade dos sarcômeros no músculo estriado.

A busca dos cDNAs que codificam as subunidades α e β de *S. plumieri* prosseguiu e regiões semelhantes com a subunidade α (Figura 33) foram obtidas quando os primers utilizados nas reações de PCRs tinham como alvo a ser amplificado um fragmento menor que a toxina completa e os primers correspondiam a regiões conservadas dentre as toxinas. Então, os primers continham ao menos dois resíduos catiônicos (par de primers Cat α), já que é relatado que as proteínas citolíticas isoladas de peçonhas de vários organismos contêm um motivo hidrofóbico flanqueado por resíduos catiônicos essenciais para a formação de poros nas membranas responsável pelo efeito hemolítico (KINI; EVANS, 1989). Essa propriedade tem sido atribuída às toxinas de Scorpaeniformes.

No caso da subunidade β , o primeiro fragmento (Figura 37) foi obtido com primers que continham pelo menos um resíduo de Cys (par de primers CD β), altamente conservado em toxinas de Scorpaeniformes (MÉNEZ, 1993).

Nesse trabalho, foram identificadas as sequências de cDNAs que codificam para toxinas hipotéticas nesses peixes (Tabela 21). As estruturas primárias protéicas deduzidas correspondentes às subunidades α e β , nomeadas respectivamente de SpTx- α (Figura 35) e SpTx- β (Figura 38) foram identificadas com sucesso através de técnicas de clonagem de cDNAs utilizando primers construídos a partir de sequências aminoacídicas altamente conservadas descritas para as toxinas de lionfish e stonefish (GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006).

Até o presente, utilizando métodos de clonagem direto do cDNA, sete toxinas foram identificadas e suas estruturas protéicas primárias deduzidas, sendo três isoladas de lionfish, duas de stonefish, uma de waspfish e uma de devil stinger

(GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006; KIRIAKE; SHIOMI, 2011; KIRIAKE et al., 2013).

Peçonhas de peixes Scorpaeniformes estão distribuídas principalmente em três famílias: scorpionfish e lionfish da família Scorpaenidae, soldierfish e waspfish da família Tetraogidae e devil stinger e stonefish da família Synanceiidae (SMITH; WHEELER, 2006; SHINOHARA; IMAMURA, 2007). As toxinas que foram isoladas até agora provaram que nessa Ordem os peixes contêm proteínas estruturalmente similares às toxinas de stonefish, inicialmente estudadas em 1965, por Austin e colaboradores, sugerindo uma ampla (provavelmente universal) distribuição de toxinas semelhantes nas peçonhas de Scorpaeniformes, independente de qual família o peixe pertence.

Toxinas de stonefish, tais como NeoVTX de *Synanceia verrucosa* e SNTX de *Synanceia horrida* exibem atividades hemolítica e letal em camundongos (KREGER, 1991; KHOO et al., 1992; SHIOMI et al., 1993). Em adição, essas toxinas possuem outras atividades biológicas como aumento da permeabilidade capilar e indução de edema, entretanto efeitos hipotensivos são observados principalmente em relação à SNTX (KHOO et al., 1992; LOW et al., 1993). Portanto, é razoável assumir que as atividades letal, hemolítica, cardiovascular e edematogênica detectadas na peçonha total de *S. plumieri* são provocadas principalmente pela propriedade citolítica de Sp-CTx, como já foi sugerido em outros trabalhos (CARRIJO et al., 2005; GOMES et al., 2010; ANDRICH et al., 2011; GOMES et al., 2013).

As sequências deduzidas de SpTx (subunidades α e β) encontram-se em uma janela de leitura semelhante ao descrito em base de dados para outras toxinas Scorpaeniformes, além disso, a sequência de fragmentos peptídicos obtidos da digestão trípica da toxina isolada de *S. plumieri*, Sp-CTx (GOMES et al., 2013) foram idênticos aos encontrados nas subunidades. Assim, oito peptídeos foram identificados na SpTx- α , doze reconhecidos na SpTx- β e somente um deles foi comum em ambas as subunidades. De posse desta informação podemos sugerir, que a toxina α ou β de *S. plumieri* relatadas nesse trabalho correspondem a toxina Sp-CTx já estudada, embora até o momento não existam informações detalhadas da estrutura primária da toxina.

No presente estudo, descrevemos que SpTx existe na forma de duas subunidades (α e β) com tamanhos semelhantes. Foi possível reconstruir cada

subunidade gerando duas ORFs de 2.106 bp traduzida “*in silico*” em 702 resíduos e que apresentaram massas moleculares preditas de 80,153 kDa para a subunidade α e 79,816 para a subunidade β .

Gomes e colaboradores (2013) hipotetizaram que Sp-CTx fosse composta por duas subunidades, já que quando Sp-CTx foi submetida a eletroforese PAGE-SDS em condições redutoras apresentou banda única de 71 kDa e sob condições não-redutoras apresentou uma banda adicional difusa com massa molecular aproximada de 150 kDa. A discrepância nas massas moleculares estimadas de SpTx e SpCT-x pode ser atribuída às condições das colunas de purificação e dos solventes utilizados para obtenção da proteína.

A comparação das sequências aminoacídicas das subunidades α e β de SpTx com outras proteínas utilizando o algoritmo BLAST não revelaram homologia significativa com outras proteínas no banco de dados, com exceção das toxinas de Scorpaeniformes (Figura 36 e 39). Então, é sugerido que juntamente com as subunidades descritas em peixes, SpTx isolada de *S. plumieri* pertence a família de toxinas marinhas SNTX/VTX (GHADESSY et al., 1994; UEDA et al., 2006).

Nas sequências obtidas para SpTx- α e SpTx- β , nenhum peptídeo sinal é reconhecido, de maneira semelhante ao que ocorre com todas as toxinas descritas até o momento em Scorpaeniformes. É interessante notar a presença de Ser-2 ou Ser-3 em SpTx, após o resíduo de Met inicial. A presença de Ser, Ala ou Gly após o iniciador Met é conhecida por favorecer a remoção da Met e promover a N-acetilação da região N-terminal (AUSUBEL, 1995). No caso, NeoVTX- α isolada de *Synanceia verrucosa* possui uma Ser-2 e foi evidenciado que o N-terminal é bloqueado como confirmado por sequenciamento e, então, foi assumido que a proteína madura da subunidade α não possui o iniciador Met e possui Ser N-acetilada no extremo N-terminal (UEDA et al., 2006).

A ausência do peptídeo sinal pode ser explicada já que, observações sugerem que a secreção de SpTx pelo lúmen das glândulas de peçonha de *S. plumieri* difere do modelo clássico de secreção de proteínas em células eucarióticas, as quais são secretadas com a ajuda do peptídeo sinal presente na região N-terminal (MÉNEZ, 1993). Em nenhuma das sequências deduzidas de SpTx foram encontradas sequências N-terminais com características típicas de peptídeos sinais, caracterizadas pela

ausência de resíduos carregados positivamente e presença de uma extensão de aproximadamente dez resíduos apolares.

Além disso, em SpTx não se observam alvos para modificações associadas com proteínas secretadas via retículo endoplasmático-Golgi. Embora tenham sido reconhecidos dez sítios putativos de glicosilação-Asn (seis na SpTx- α e quatro na SpTx- β), toxinas purificadas pertencentes a esta categoria não mostraram glicosilação (GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006). A ausência de processamento pós-traducional foi corroborada por Gopalakrishnakone e Gwee, 1993, ao realizarem um estudo morfológico detalhado das glândulas de peçonha de *Synanceia horrida*, no qual foi proposto um modo de secreção não-clássico (tipo holócrino) para as toxinas de *Synanceia* (GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006). A microscopia de luz mostrou a presença de células glandulares de várias formas e tamanhos, algumas das quais continham grânulos. Similares observações foram relatadas em *Synanceia trachinis*, *Notesthes robusta* e em algumas espécies de *Pterois* e *Scorpaena* (HALSTEAD, 1988), embora os mecanismos exatos de formação de grânulos ou modo de secreção ainda são discutidos. As estruturas protéicas das toxinas de Scorpaeniformes estão de acordo com o modo de secreção de peçonhas, uma vez que essas proteínas não apresentam modificações pós-traducionais. Isso foi estendido para as toxinas de *Pterois* (lionfish) (KIRIAKE; SHIOMI, 2011) *Inimicus* (devil stinger) e *Hypodytes* (waspfish) (KIRIAKE et al., 2013) e, nesse trabalho para SpTx de *S. plumieri* (scorpionfish).

SpTx apresentou uma identidade maior que 50% ao comparar as subunidades α e β de *S. plumieri* (Tabela 22). Uma identidade semelhante também foi verificada entre as subunidades das toxinas de stonefish (UEDA et al., 2006). Em contrapartida, as toxinas de lionfish apresentaram identidade aproximada de 80%. Como discutido para SNTX (GHADESSY et al., 1996) e baseando na alta identidade entre as sequências, as subunidades α e β de SpTx provavelmente correspondem a dois genes que evoluíram separadamente de um ancestral comum após duplicação gênica.

A similaridade entre as sequências de Scorpaeniformes é um forte indicativo de que existem similaridades conformacionais entre as toxinas. Como os resíduos de Cys são implicados na conformação protéica através da formação de pontes dissulfeto, a localização desses aminoácidos merece análise. SpTx contém 18 resíduos de Cys,

sendo sete presentes na subunidade α e onze na subunidade β . Dentre esses resíduos, alguns parecem estar envolvidos em pontes dissulfeto e outros se encontram na forma tiol livre (GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006). O número de grupos tióis livres presentes na toxina SNTX foram determinados através da titulação com DTNB e revelaram que há cinco Cys livres por molécula, sendo que dez Cys restantes possivelmente estão envolvidas em cinco pontes dissulfeto intracadeia (GHADESSY et al., 1996).

Nesse contexto, vale a pena mencionar que SpTx contém no total onze Cys conservadas (cinco na SpTx- α e seis na SpTx- β) em todas as toxinas já caracterizadas em Scorpaeniformes, sendo que cinco resíduos de Cys estão localizados em posições conservadas (204, 374, 406, 524 e 568) entre as subunidades α e β (Figura 36 e 39). Dessa maneira, é assumido que pelo menos duas ou quatro destas Cys conservadas de cada subunidade são associadas com pontes dissulfeto intracadeia.

Quando as subunidades de SpTx foram alinhadas entre si, os resultados revelaram que cinco resíduos de Cys estão localizados em posições idênticas (204, 374, 406, 470 e 568) (Figura 40) destas somente o resíduo da posição 470 não foi conservado na subunidade α , se comparado com as toxinas já descritas. Então, esse alinhamento torna possível sugerir a formação de cinco pontes dissulfeto identicamente posicionadas em cada uma das subunidades, as quais podem contribuir para a formação de regiões essencialmente conservadas em torno das quais modificações evolutivas podem ser feitas (MÉNEZ et al., 2006).

Como relatado para outras toxinas de Scorpaeniformes, em SpTx foi reconhecido um domínio B30.2/SPRY na região C-terminal de cada subunidade. Este domínio também está presente em várias famílias de proteínas, tais como TRIM ou RBCC (RING-finger, B-box e coiled-coil), BTN (butirofilina) e SPSB (proteína Box de sinalização por citocinas) (PERFETTO et al., 2013).

Neste trabalho foram identificados três motivos altamente conservados (LDP, WEVE e LDYE) que fazem parte do domínio B30.2/SPRY. O motivo LDP foi reconhecido na estrutura de SpTx- α e em SpTx- β com modificações, o motivo WEVE foi reconhecido nas duas subunidades e o motivo LDYE também foi identificado nas duas subunidades, embora com modificações (Tabela 23). A literatura sugere que o domínio B30.2/SPRY é importante durante as interações entre proteínas. Considerando que as sequências de

aminoácidos desses domínios são altamente variáveis nas proteínas, é especulado que o domínio contendo B30.2/SPRY reconhece outro ligante protéico específico através do motivo consenso (WOO et al., 2006). Entretanto, até o presente nenhum dado experimental existe sobre o(s) ligante(s) protéico(s) envolvidos com o domínio B30.2/SPRY de peixes Scorpaeniformes, apesar que a xantina oxidase foi sugerida como um ligante potencial (HENRY et al., 1998). Nesse contexto é interessante notar que quando a Stonustoxina isolada de *Synanceia horrida* é inoculada, a toxina provoca uma liberação de óxido nítrico ou substâncias nítricas oxidadas (LOW et al., 1993). Como a xantina oxidase é conhecida por inibir a óxido nítrico sintase (RENGASAMY; JOHNS, 1993), é possível que a ligação do domínio B30.2 da Stonustoxina com a xantina oxidase previne a inibição resultando em um aumento de óxido nítrico. Para melhor entender os mecanismos moleculares pelos quais as toxinas de Scorpaeniformes exercem uma variedade de atividades biológicas, é essencial elucidar os possíveis ligantes para domínio B30.2/SPRY.

A atividade citolítica de muitas proteínas e peptídeos ocorre devido à habilidade em tornar as membranas das células mais permeáveis. Isso é atribuído pela presença de segmentos hidrofóbicos em α -hélices e folhas β presentes em algumas proteínas. A hidrofobicidade da proteína permite que monômeros se agreguem para formar poros (PASUPULETI et al., 2012). É conhecido que, sítios catiônicos flanqueados por superfícies hidrofóbicas têm sido associados com o potencial citolítico de toxinas de Scorpaeniformes (GHADESSY et al., 1996; UEDA et al., 2006), inclusive já foi demonstrado em proteínas citolíticas, que modificações em aminoácidos carregados positivamente podem prejudicar a atividade lítica dessas proteínas (CHEN et al., 1997). Nossos resultados mostram que SpTx contém sítios catiônicos conservados e distribuídos ao longo da sequência, e muitas vezes ao lado de resíduos hidrofóbicos.

Ghadessy e colaboradores (1996), ao predizerem a estrutura secundária da Stonustoxina de *Synanceia horrida* propuseram que as α -hélices responsáveis pelo mecanismo de ação da toxina foram similares às α -hélices putativas identificadas aqui para SpTx- α e SpTx- β como mostrado no diagrama da figura 41 desse trabalho. Foi proposto que a atividade citolítica da Stonustoxina provavelmente é mediada por um mecanismo “barrel-stave” (PASUPULETI et al., 2012) através do qual α -hélices

anfifílicas da toxina se agregam para formar poros, desestabilizando e atravessando as membranas provocando o efeito citolítico.

O N-terminal de pelo menos duas α -hélices de SpTx são flanqueados por regiões que contêm muitos resíduos básicos, com Arg-270, Lys-271 e His-273 na subunidade α (α -hélice Gln-266 a Asp-292) e Lys-302, Lys-303, Lys-304 e Lys-306 na subunidade β (α -hélice Cys-300 a Val-307). Aplicando o diagrama de “Edmundson Wheel” (SCHIFFER; EDMUNDSON, 1967) foi construído um modelo de α -hélice para as duas subunidades, como ilustrado na figura 42. As α -hélices revelaram ser anfifílicas e com potencial citolítico, provavelmente por possuírem um sítio catiônico que é comum em muitas proteínas com propriedades semelhantes, conhecidas por desempenharem um importante papel na mediação da atividade citolítica (KINI; EVANS, 1989; PASUPULETI et al., 2012).

Peptídeos contendo α -hélices são bastante estudados em função das suas atividades antimicrobianas. Muitos desses peptídeos apresentam características anfifílicas com 50% de resíduos hidrofóbicos, os quais são responsáveis por definir a anfipacidade das estruturas secundárias, entretanto as atividades citotóxicas são atribuídas também a uma combinação de outros fatores, como a sequência primária, a carga total e a posição dos resíduos catiônicos (PASUPULETI et al., 2012). Nossos resultados mostram que em SpTx foram preditos 9 regiões com potencial antimicrobiano em SpTx (4 na subunidade α e 5 na subunidade β), como demonstrado na figura 43. Interessantemente, o peptídeo antimicrobiano predito em SpTx- α da posição Phe-319 a Arg-331 (SpTx α -AP2) e o peptídeo predito em SpTx- β da posição Cys-300 a Leu-315 (SpTx β -AP2) foram localizados em regiões semelhantes aos sítios citolíticos previamente preditos em SpTx, já que são formadas por α -hélices anfifílicas flanqueadas por resíduos catiônicos.

O alinhamento do peptídeo SpTx α -AP2 (Figura 44A) variou de 40-42,85% (Tabela 25) com peptídeos temporins e brevinins relatados nas secreções de peles de anfíbios e que mostram atividades antimicrobianas e propriedades citolíticas (CONLON et al, 2003; YANG et al., 2012) e 40% de similaridade com peptídeos antimicrobianos de amplo espectro extraídos das glândulas de peçonha de vespas sociais *Vespa tropica* (YANG et al., 2013).

SpTx β -AP2 foi o único peptídeo da subunidade β que mostrou conter pelo menos três resíduos hidrofóbicos orientados na mesma superfície, que provavelmente interagem com membranas e com potencial antimicrobiano. O alinhamento deste peptídeo (Figura 44B) foi de 44,44% com o peptídeo sintético RP-1 derivado do fator 4 plaquetário que exerce atividades antimicrobianas em células sanguíneas (YEAMAN et al., 2002) e 38,88% de similaridades com o peptídeo P-10 de tunicatos, *Ciona intestinalis* (LU et al., 2014).

Para compreender as relações evolutivas que possam ocorrer entre as toxinas de peixes Scorpaeniformes, foi construída uma árvore filogenética das toxinas (Figura 45). As análises revelaram que o fator letal SpTx de *S. plumieri* possui maior similaridade na forma protéica com as toxinas do gênero *Pterois* do que com as descritas em *Synanceia* e *Inimicus*. Entretanto, observa-se que as subunidades de SpTx estão posicionadas na árvore filogenética mais proximamente de *Synanceia* e *Inimicus* do que as toxinas de *Pterois*, sugerindo que SpTx são mais próximas e provavelmente foram derivadas das toxinas de *Synanceia*. Interessantemente, nossa árvore filogenética é consistente com a classificação taxonômica realizada por Halstead (1959) baseado na morfologia das glândulas de peçonha, que dividiu os peixes Scorpaeniformes em gêneros dispostos na seguinte ordem: lionfish (*Pterois*) que possuem espinhos pequenos, scorpionfish (*Scorpaena*) com espinhos moderados e stonefish (*Synanceia*) com tecidos glandulares altamente desenvolvidos.

Contudo, nossos dados confirmam que os genes que codificam SpTx poderiam corresponder às toxinas produzidas pelas células glandulares presentes no aparato peçonhento de *S. plumieri*. De fato, é possível que as subunidades de SpTx se associem formando dímeros ou tetrâmeros, proposta já hipotetizada para Sp-CTx por Andrich e seus colaboradores, 2010 e também descritas nas toxinas de stonefish e lionfish (GARNIER et al., 1995; POH et al., 1991; UEDA et al., 2006; KIRIAKE; SHIOMI, 2011).

Aparentemente, as subunidades de SpTx mostram semelhanças no que diz respeito às estruturas primárias e atividades biológicas com as toxinas caracterizadas nos peixes Scorpaeniformes: stonefish, lionfish, waspfish e devil stinger. Essas toxinas tiveram suas estruturas primárias determinadas utilizando estratégias semelhantes de clonagem do cDNA. Por fim, o acúmulo de informações sobre a estrutura primária de toxinas é de interesse para futuros estudos nas relações entre a estrutura-atividade.

O fragmento de DNA de 1.5 kb da subunidade β identificado na biblioteca e um segundo fragmento de 1.2 kb da subunidade α obtido por reação de PCR direto dos cDNAs foram marcados independentemente por reações de PCR com dCTP [α - ^{32} P] (Figura 46) para screening de aproximadamente 10.000 colônias para cada uma das subunidades. Durante o screening com sondas radioativas foram identificadas 127 ESTs de boa qualidade (Figura 48), sendo 48% com tamanho igual ou superior a 500 bp (Figura 47).

Apesar do grande número de clones sequenciados, o uso desse método não foi eficiente em isolar clones relacionados a toxinas hipoteticamente presentes na biblioteca de *S. plumieri*, como era esperado. Apesar disso, um peptídeo citolítico formado de 20 resíduos de aminoácidos com repetições em tandem foi detectado na biblioteca como uma única EST (Figura 49). É possível que esses peptídeos sejam encontrados isolados naturalmente e, durante os passos que antecedem a clonagem esses pequenos cDNAs se uniram para posterior ligação do vetor ou simplesmente um precursor de mRNA com vários peptídeos foram processados após a tradução. Uma busca no banco de dados revela a presença de muitos peptídeos similares preditos por análise computacional derivadas de sequências genômicas de outros peixes além do alinhamento com peptídeos citotóxicos de Invertebrados marinhos, portanto é razoável assumir que o efeito citolítico exercido por eles esteja associado com o envenenamento por peixes-escorpião.

Apesar de o gênero *Scorpaena* habitar regiões tropicais, o screening com radioativo permitiu a identificação de duas ESTs para glicoproteínas anticongelantes e uma EST para proteína de ligação ao RNA induzida pelo frio (Tabela 26). Essas proteínas são particularmente importantes no sangue de peixes da Antártica, pois evitam o congelamento dos mesmos em ambientes que são perpetuamente gelados (CHENG; CHEN, 1999).

No estudo foram também identificados novos genes relacionados ao sistema imune, como duas ESTs relacionados à akirina-2. Essa proteína, em camundongos funciona nas vias de sinalização do tipo toll-like (TLR), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)-1 β (MACQUEEN; JOHNSTON, 1999). Além disso, foi identificada uma EST que alinhou com adrenomedulina, já caracterizada em outros peixes (KONO; SAKAI, 2004; OGOSHI et al., 2003). Esses genes são expressos constitutivamente em

vários órgãos e a sua expressão é aumentada em resposta a lipopolissacarídeos (LPS). Outros genes responsáveis por mecanismos de defesa do organismo também foram encontrados, como duas ESTs que alinharam com a proteína 5 de melanona associada com a diferenciação celular (MDA5), a qual é conhecida por possuir funções típicas de reconhecimento de dsRNA atuando como um sensor para infecções virais (KANG et al., 2002).

Genes relacionados à imunidade adaptativa também foram encontrados na biblioteca no screening com radioativo, como o antígeno MHC classe Ia, um gene supressor de tumor derivado de células B, como o Krueppel-like fator 6, além de um EST que alinhou com β -timosina inicialmente isolada do timo e encontrada quase exclusivamente em células de animais multicelulares.

Considerações finais

Nesta parte serão reportadas as conclusões e perspectivas do nosso trabalho.

5.0. Conclusão

1- O projeto de sequenciamento de DNAs da biblioteca de *S. plumieri* gerou, até o momento, 573 ESTs sequências parciais de qualidade, a partir de clones selecionados por três métodos de screening (randômico, na presença de anticorpos e com sondas radioativas). Destes clones, pelo menos 233 (40%) foram considerados como ESTs representativas e agrupadas em 95 genes distintos, sendo destes, 67 cópias únicas, ou seja, não redundantes e identificadas uma vez, as restantes, 166 ESTs tiveram diferentes frequências com duas ou mais cópias e representaram 28 tipos de genes redundantes.

2- Apesar da redundância verificada na biblioteca foi possível obter após seleção, uma ampla variedade de transcritos, tais como enzimas relacionadas ao metabolismo, proteínas estruturais, de sinalização e regulatórias relacionadas a diferentes funções como a homeostasia, sistema imunológico e proteínas do ciclo celular. Além disso, alguns genes foram especulados participarem dos mecanismos de secreção de toxinas e outros como participantes do envenenamento por peixes-escorpião.

3- A diversidade de genes, nunca antes descritos em *S. plumieri* enfatiza a eficácia da abordagem desse projeto para a identificação de genes potencialmente importantes na biologia do peixe-escorpião.

4- Lectinas foram transcritos altamente abundantes na biblioteca. Foram encontradas um total de 69 ESTs de sequências parciais para lectinas relatadas que perfizeram um total de 12% da biblioteca, após a eliminação de sequências de baixa qualidade. A frequência de cDNAs na biblioteca é uma reflexão direta da frequência de mRNA nas glândulas de peçonha. Nós pressumimos que esses transcritos altamente expressos provavelmente contribuem com o envenenamento, além de constituírem um repertório de defesa do animal contra eventuais predadores ou parasitas.

5- Uma toxina majoritária nas glândulas de peçonha de *S. plumieri* nomeada SpTx constituída por duas subunidades (α e β) foi encontrada nas glândulas de peçonha do peixe-escorpião. Estes genes foram construídos através de reações RT-PCRs utilizando primers desenhados a partir de sequências de DNA altamente conservadas em peixes Scorpaeniformes.

6- As sequências consensos dos cDNAs completos totalizaram 2.192 bp para a subunidade α e 2.180 bp para a subunidade β . Ambas as subunidades produziram uma ORF de 702 aminoácidos e o alinhamento entre as sequências, revelaram que elas são consideravelmente homólogas, apresentando um total de identidade de 54% e uma similaridade de 76%.

7- Sequências traduzidas da proteína SpTx não mostraram homologia significativa com outras toxinas utilizando o algoritmo BLAST, com exceção do alinhamento com fatores letais descritos em Scorpaeniformes, então presumimos que se trata de uma nova proteína e sua estrutura primária foi incluída como novo membro da família SNTX/VTX de toxinas marinhas.

6.0. Perspectivas

Finalizado o projeto de sequenciamento parcial de ESTs da biblioteca de cDNAs, surgiram perspectivas para a continuação do desenvolvimento do projeto do peixe-escorpião.

A caracterização parcial da biblioteca demonstrada nesse trabalho permitiu a identificação de sequências de genes que codificam proteínas com semelhanças com toxinas previamente descritas e, que provavelmente contribuem com os sintomas após o envenenamento. Transcritos de cDNAs que codificam as subunidades α e β putativas foram obtidos através de reações RT-PCRs e, depois juntados para tentativas de expressão de toxinas recombinantes em sistema bacteriano. Para isso, inicialmente o fragmento de interesse será clonado com o kit pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning with One Shot[®] TOP10 *E. coli* (Invitrogen[™], Life Technologies, Inc.), para produzir um clone de entrada que será recombinado com o vetor de destino pDEST[™]17, utilizando

Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix. Posteriormente, a reação de recombinação será transferida para as células eletrocompetentes DH5 α e os clones positivos selecionados para a produção de clones de expressão. Após o isolamento do DNA plasmidial, este será transformado em células *E. coli* de expressão BL21-AI™ e, posteriormente cultivadas na presença do indutor L(+)-arabinose.

Como primeiro passo para estabelecer as propriedades bioquímicas da toxina hemolítica encontrada no peixe-escorpião será realizado experimentos de expressão em *E. coli* na tentativa de produzir proteínas recombinantes. As toxinas descritas em peixes-escorpião apresentam ausência de certas modificações pós-traducionais associadas com o aparato de Golgi, como a ausência de sítios potenciais de glicosilação, característica que reforça a viabilidade de expressão em sistema bacteriano (CAMERON e ENDEAN, 1972; GOPALAKRISHNAKONE e GWEE, 1993; GHADESSY et al., 1996).

O screening da biblioteca, também permitiu identificar vários clones que codificam lectinas-like proteínas, que alinharam principalmente com fish-egg e lily-type lectinas. O estudo da expressão dos genes relacionados com o sistema imune é necessário para melhor compreensão da participação dessas moléculas nos mecanismos de envenenamento por peixes-escorpião.

Uma vez que, proteínas recombinantes expressas como proteínas de fusão sejam capazes de induzir respostas imunológicas aportaria ferramentas biológicas para posterior delimitação das funções biológicas dos componentes tóxicos. Ducancel et al., 1989, relatou que a neurotoxina erabutoxina-a recombinante de serpente marinha, foi mais imunogênica do que a toxina nativa.

Nesse sentido, há a possibilidade de expressar fragmentos de cDNAs putativos para regiões específicas da proteína madura referente às duas subunidades encontradas em *S. plumieri*, para exemplificar, nesse trabalho nós apresentamos um clone que codifica um polipeptídeo de 181 resíduos de aminoácidos putativos para a região C-terminal da subunidade β (CD β r-f e Syn β -r). A expressão desse fragmento é de interesse, porque essa região codifica o domínio B30.2/SPRY, o qual possuem funções ainda desconhecidas. Uma vez produzido a proteína recombinante, experimentos serão realizados na tentativa de compreender possíveis ligantes, interações proteína-proteína, assim como delinear a importância desses domínios para

entender os mecanismos moleculares pelos quais as toxinas exercem a variedade de atividades biológicas observadas durante o envenenamento por peixes-escorpião.

Portanto, a produção de proteínas recombinantes pode ter um possível uso no desenvolvimento de anti-soros específicos contra o envenenamento por *S. plumieri*, já que a única forma de tratamento contra os acidentes é com o uso do antiveneno produzido contra a peçonha total de *Synanceia trachynis*, disponível comercialmente (Commercial Stonefish Antivenom, SFAV, Melbourne, Austrália), que é capaz de neutralizar atividades letais, hemolíticas e cardiovasculares de acidentes provocados por peixes-escorpião (SHIOMI et al., 1989; GOMES et al., 2011; CHURCH e HODGSON, 2002b).

Quando conseguirmos produzir proteínas recombinantes, experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*” serão realizados em colaboração com o grupo da professora Dra. Suely G. Figueiredo do Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, objetivando delinear possíveis funções biológicas e aplicações biotecnológicas para essas proteínas.

Além disso, possivelmente novas produções de ESTs poderão ser realizadas no laboratório utilizando novas técnicas de screening, como por exemplo, a realização de um pré-screening. O uso de sondas dos clones mais frequentes provavelmente aumenta a possibilidade de selecionarmos clones de genes ainda não sequenciados ou genes raros presentes na biblioteca. Nesse caso, a produção de uma biblioteca subtrativa seria útil para a identificação de novos genes ainda não descritos em *S. plumieri*, assim como aumentar a representatividade da biblioteca (AUSUBEL, 1995; SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A construção de bibliotecas subtrativas de *S. plumieri* seria útil para identificar transcritos menos abundantes. Técnicas recentes como SSH (Suppression subtractive hybridization) e microarrays têm sido utilizadas para estudar genes diferencialmente expressos em várias situações (YANG et al., 1999; MUNIR et al., 2004; FAN et al., 2014). A combinação dessas técnicas permite a descoberta de genes induzidos ou suprimidos por um tratamento particular e o isolamento de cDNAs diferencialmente expresso sem um conhecimento a priori da sua sequência, que é altamente desejável para o estudo de genes em sistemas em que a informação genômica do organismo é

escassa, em adição técnicas SSH têm mostrado que são capazes de enriquecer uma biblioteca 100 X com mensageiros raros em um único passo de hibridização subtrativa.

Referências bibliográficas

ADAMS, M. D.; *et al.* Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, v.377, p.3.174, 1995.

ALBINS, M. A.; HIXON, M.A. Invasive Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce recruitment of Atlantic coral-reef fishes. **Marine Ecology Progress Series**, v.367, p.233-238, 2008.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

ALVARENGA, E. R. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v.2, p.210-220, 2012.

ANDRICH, F.; CARNIELLI, J. B. T.; CASSOLI, J. S.; LAUTNER, R. Q.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C.; DE LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G. A potent vasoactive cytolysin isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. **Toxicon**, v.56, p.487-496, 2010.

ARASU, A.; KUMARESAN, V.; SATHYAMOORTHY, A.; PALANISAMY, R.; PRABHA, N.; BHATT, P.; ROY, A.; THIRUMALAI, M. K.; GNANAM, A. J.; PASUPULETI, M.; MARIMUTHU, K.; AROCKIARAJ, J. Fish lily type lectin-1 contains β -prism architecture: Immunological characterization. **Molecular Immunology**, v.56, p.497-506, 2013.

AUERBACH, P. S.; MCKINNEY, H. E.; REES, R. S.; HEGGERS, J. P. Analysis of vesicle fluid following the sting of the lionfish *Pterois volitans*. **Toxicon**, v.25(12), p.1350-1353, 1987.

AUSTIN, L.; GILLIS, R. G.; YOUATT, G. Stonefish venom: some biochemical and chemical observations. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v.43, p.79-90, 1965.

AUSUBEL, F. M. *Current Protocols in Molecular Biology*. AUSUBEL, F.; BRENT, M. R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds). New Jersey: John Wiley and Sons Inc. Hoboken, 1995. 5300 p.

BARRE, A.; BOURNE, Y.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; ROUGE, P. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar recognition process. **Biochimie**, v.83, p.645-651, 2001.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.7-16, 2003.

BORGSTROM, E.; LUNDIN, S.; LUNDEBERG, J. Large scale library generation for high throughput sequencing. **PLoS ONE**, v.6(4): e19119, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. *Venomous animals and their venoms*. 2. ed. London: Academic Press, 1971, 687p.

CAMERON, A. M.; ENDEAN, R. The venom glands of teleost fishes. **Toxicon**, v.10, p.301-303, 1972.

CARRIJO, L. C.; ANDRICH, F.; DE LIMA, M. E.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**, v.45, p.843-850, 2005.

CARVALHO-FILHO, A. Peixes: Costa Brasileira (Fishes: Brazilian Coast). Melro: São Paulo, p.92-94, 1999.

CASE, R. M.; ANSAH, T. A.; DHO, S.; MIZINIAK, A.; WILSON, L. Calcium homeostasis in exocrine secretory cells. In: GERDAY, C. H.; GILLES, R.; BOLIS, L. (Eds.). *Calcium and calcium binding proteins. Molecular and functional aspects*. Berlin Heidelberg: New York, 1988, p.211-219.

CASSOLI, J. S. Purificação e caracterização bioquímica parcial de uma hialuronidase presente da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena* (MSc Dissertation). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

CHEN, D.; KINI, R. M.; YUEN, R.; KHOO, H. E. Haemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. **Biochemistry Journal**, v.325, p.685-691, 1997.

CHENG, C-H. C.; CHEN, L. Evolution of an antifreeze glycoprotein. A blood protein that keeps Antarctic fish from freezing arose from a digestive enzyme. **Brief communications Nature**, v.401, p.443-444, 1999.

CHHATWAL, I.; DREYER, F. Biological properties of a crude venom extract from the greater weever fish *Trachinus draco*. **Toxicon**, v.30, p.77-85, 1992a.

CHHATWAL, I.; DREYER, F. Isolation and characterization of dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Trachinus draco*. **Toxicon**, v.30, p.87-93, 1992b.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.

CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. Stonefish (*Synanceia* spp.) antivenom neutralizes the *in vitro* and *in vivo* cardiovascular activity of soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. **Toxicon**, v.39, p.319-324, 2001.

CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. **Toxicon**, v.40, p.787-796, 2002a.

CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, v.40, p.1083-1093, 2002b.

COLASANTE, C.; MEUNIER, F. A.; KREGER, A. S.; MOLGÓ, J. Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. **European Journal of Neuroscience**, v.8, p.2149-2156, 1996.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v.21, p.3674-3676, 2005.

CONLON, J. M.; SONNEVEND, A.; PATEL, M.; CAMASAMUDRAM, V.; NOWOTNY, N.; ZILAH, E.; IWAMURO, S.; NIELSEN, P. F.; PÁL, T. A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. **Biochemistry Biophysical Research Communication**, v.306, p.496-500, 2003.

DEAKINS, D. E.; SAUNDERS, P. R. Purification of the lethal fraction of the venom of the stonefish *Synanceja horrida* (Linnaeus). **Toxicon**, v.4, p.257-262, 1967.

DONNELLY, S. R.; MOSS, S. E. Annexins in the secretory pathway. **Cell Molecular Life Science**, v.53, p.533-538, 1997.

DUCANCEL, F.; BOULAIN, J-C.; TREMEAU, O.; MENEZ, A. Direct expression in *E. coli* of a functionally active protein A- snake toxin fusion protein. **Protein Engineering**, v.3, p.139-143, 1989.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, p.827-839, 2001.

EVANGELISTA, K. L.; ANDRICH, F.; REZENDE, F. F.; NILAND, S.; CORDEIRO, M. N.; HORLACHER, T.; CASTELLI, R.; SCHMIDT-HEDERICH, A.; SEEBERGER, P. H.; SANCHEZ, E. F.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G.; EBLE, J. A. Plumieribetin, a fish lectin homologous to mannose-binding B-type lectins, inhibits the collagen-binding $\alpha_1\beta_1$ integrin. **The journal of biological chemistry**, v.284, p.34747-34759, 2009.

FAHIM, F. A.; ESMAT, A. Y.; MADY, E. A.; AHMED, S. M.; ZAKI, M. A. Biological activities of the crude skin toxin of the Suez Gulf Oriental catfish (*Plotosus lineatus*) and its antitumor effect *in vivo* (mice). **Journal of Natural Toxins**, v.11, p.283-295, 2002.

FAN, Q-J.; YAN, F-X.; QIAO, G.; ZHANG, B-X.; WEN, X-P. Identification of differentially-expressed genes potentially implicated in drought response in pitaya (*Hylocereus undatus*) by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis. **Gene**, v.533, p.322-331, 2014.

FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, 9: 279, 2008.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil (Handbook of marine fishes of Southeast of Brazil). Museu de Zoologia: Universidade de São Paulo, São Paulo, p.14-18, 1980.

FIGUEIREDO, S. G.; ANDRICH, F.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; HADDAD Jr, V. Venomous Fish: A brief overview. In: De LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M. C.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R.; ROCHAT, H. (Eds). *Animal toxins: State of the art. Perspectives on Health and Biotechnonology*. 1 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2009, p.73-95.

FLOWER, D. R.; ATTWOOD, T. K.; NORTH, A. C. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. **Protein Science**, v.2, p.753-761, 1993.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C. *Manual para Normalização de publicações técnico-científicas*. 8. ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2007. 255p.

GALLIANO, M.; MINCHIOTTI, L.; CAMPAGNOLI, M.; SALA, A.; VISAI, L.; AMORESANO, A.; PUCCI, P.; CASBARRA, A.; CAUCI, M.; PERDUCA, M.; MONACO, H. L. Structural and biochemical characterization of a new type of lectin isolated from carp eggs. **Biochemistry Journal**, v.376, p.433-440, 2003.

GANZ, T. Iron in innate immunity: starve the invaders. **Current Opinion in Immunology**, v.21, p.63-67, 2009.

GARNIER, P.; GOUDEY-PERRIÈRE, F.; BRETON, P.; DEWULF, C.; PETEK, F.; PERRIÈRE, C. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* BLOCH AND SCHNEIDER, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. **Toxicon**, v.33, p.143-155, 1995.

GARNIER, P.; GROSCLAUDE, J. M.; GERVAT, V.; GOUDEY-PERRIÈRE, F.; GAYRAL, P.; JACQUOT, C.; PERRIÈRE, C. Biogenic amines (noradrenaline, dopamine and tryptophan) in stonefish venom. Identification of nor adrenaline in *Synanceia verrucosa*. **Toxicon**, v.34, p.1088, 1996.

GARNIER, P.; DUCANCEL, F.; OGAWA, T.; BOULAIN, J.-C.; PERRIÈRE, F. G.; PERRIÈRE, C.; MÉNEZ, A. Complete amino-acid sequence of the β -subunit of VTX from venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) as identified from cDNA cloning experiments. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1337, p.1-5, 1997a.

GARNIER, P.; SAUVIAT, M. P.; PERRIÈRE, F. G.; PERRIÈRE, C. Cardiotoxicity of verrucotoxin, a protein isolated from the venom of *Synanceia verrucosa*. **Toxicon**, v.35, p.47-55, 1997b.

GHADESSY, F. J.; JEYASEELAN, K.; CHUNG, M. C. M.; KHOO, H. E.; YUEN, R. A genomic region encoding stonefish (*Synanceja horrida*) stonustoxin beta-subunit contains an intron. **Toxicon**, v.32, p.1684-1688, 1994.

GHADESSY, F. J.; CHEN, D.; KINI, R. M.; CHUNG, C. M.; JEYASEELAN, K.; KHOO, H. E.; YUEN, R. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom cDNA cloning and characterization. **The journal of biologic chemistry**, v.271, p.25575-25581, 1996.

GOMES, H. L.; ANDRICH, A.; MAUAD, H.; SAMPAIO, K. N.; DE LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; MOYSÉS, M. R. Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. **Toxicon**, v.55, p.580-589, 2010.

GOMES, H. L.; MENEZES, T. N.; CARNIELLI, J. B.; ANDRICH, F.; EVANGELISTA, K. S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; VASSALLO, D. V.; FIGUEIREDO, S. G. Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. **Toxicon**, v.57, p.992-999, 2011.

GOMES, H. L.; ANDRICH, F.; FORTE-DIAS, C. L.; PERALES, J.; FERREIRA, A. T.; VASSALO, D. V.; CRUZ, J. S.; FIGUEIREDO, S. G. Molecular and biochemical characterization of a cytolytic from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: Evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane. **Toxicon**, v.74, p.92-100, 2013.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; GWEE, M. C. E. The structure of the venom gland of stonefish *Synanceia horrida*. **Toxicon**, v.31, p.979-988, 1993.

GWEE, M. C. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; YUEN, R.; KHOO, H. E.; LOW, K. S. Y. A review of stonefish venoms and toxins. **Pharmacology & Therapeutics**, v.64, p.509-528, 1994.

HADDAD Jr. V. Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento (Atlas of dangerous aquatic animals of Brazil: a medical guide of identification and treatment). São Paulo: Roca, 2000.

HADDAD Jr. V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil (Aquatic animals of medical importance in Brazil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.591-597, 2003.

HADDAD Jr, V.; MARTINS, I. A.; MAKYAMA, H. M. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. **Toxicon**, v.42, p.79-83, 2003.

HADDAD Jr., V.; GARRONE-NETO, D.; DE PAULA NETO, J. B.; MARQUES, F. P. L.; BÁRBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, v.43, p.287-294, 2004.

HALSTEAD, B. W. *Dangerous marine animals*. 1. ed. Cambridge: Cornell Maritime Press, 1959, 146p.

HALSTEAD, B.W. Venomous marine animals of Brazil. **Memórias Instituto Butantan**, v. 33, p. 1-26, 1966.

HALSTEAD, B. W. *Dangerous marine animals: that bite, sting, shock, are non-edible*. 2. ed. Maryland: Cornell Maritime Press, 1980. 208p.

HALSTEAD, B. W. Class Osteichthyes: Venomous Scorpionfishes. In: BRUCE W. HALSTEAD, M.D. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. 2. ed., New Jersey: The Darwin Press, 1988, pp.839-906.

HAHN, S. T.; O'CONNOR, J. M. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. **Toxicon**, v.38, p.79-89, 2000.

HENRY, J.; MATHER, I. H.; MCDERMOTT, M. F.; PONTAROTTI, P. B30.2-like domain proteins: Update and new insights into a rapidly expanding family of proteins. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.1696-1705, 1998.

HENRY, J.; RIBOUCHON, M. T.; OFFER, C.; PONTAROTTI, P. B30.2-like domain proteins: a growing family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.235, p.162-165, 1997.

HOPKINS, B. J.; HODGSON, W. C.; SUTHERLAND, S. K. Pharmacological studies of stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. **Toxicon**, v.32, p.1197-1210, 1994.

HOPKINS, B. J.; HODGSON, W. C. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). **Toxicon**, v.36, p.973-983, 1998.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, p.868-877, 1999.

HULO, N.; BAIROCH, A.; BULLIARD, V.; CERUTTI, L.; DE CASTRO, E.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S.; PAGNI, M.; SIGRIST, C. J. A. The PROSITE database. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.D227-D230, 2006.

HUMANN, P. *Reef fish identification: Florida, Caribbean, Bahamas*. 2. ed. Ned Deloach: New World Publications, 1994. 426p.

IWANA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, v.39, p.901-909, 1999.

JIA, Y.; CANTU, B. A.; SANCHEZ, E. E.; PÉREZ, J. C. Complementary DNA sequencing and identification of mRNAs from the venomous gland of *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. **Toxicon**, v.51, p.1457-1466, 2008.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v.299, p.279–291, 2002.

KANG, D-C.; GOPALKRISHNAN, R. V.; WU, Q.; JANKOWSKY, E.; PYLE, A. M.; FISHER, P. B. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth suppressive properties. **PNAS**, v.99, p.637-642, 2002.

KHOO, H. E.; YUEN, R.; POH, C. H.; TAN, C. H. Biological activities of *Synanceia horrida* venom. **Natural toxins**, v.1, p.54-60, 1992.

KHOO, H. E.; HON, W. M.; LEE, S. H.; YUEN, R. Effects of stonustoxin (lethal factor from *Synanceja horrida* venom) on platelet aggregation. **Toxicon**, v.33, p.1033-1041, 1995.

KHOO, H. E.; CHEN, D.; YUEN, R. Role of free thiol groups in the biological activities of stonustoxin, a lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **Toxicon**, v.36, p.469-476, 1998.

KHOO, H. E. Bioactive proteins from stonefish venom. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p.802-806, 2002.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. **International Journal of Peptide Protein Research**, v.34, p.277-286, 1989.

KIRIAKE, A.; SHIOMI, K. Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). **Toxicon**, v.58, p494-501, 2011.

KIRIAKE, A.; SUZUKI, Y.; NAGASHIMA, Y.; SHIOMI, K. Proteinaceous toxins from three species of scorpaeniform fish (lionfish *Pterois lunulata*, devil stinger *Inimicus japonicus* and waspfish *Hypodytes rubripinnis*): Close similarity in properties and primary structures to stonefish toxins. **Toxicon**, v.70, p.184-193, 2013.

KONO, T.; SAKAI, M. Molecular cloning and expression of preproadrenomedullin gene from common carp *Cyprinus carpio*. **General and Comparative Endocrinology**, v.138, p.78-88, 2004.

KREGER, A. S. Detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). **Toxicon**, v.29, p.733-743, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-689, 1970.

LEURSEN, S. B.; DALGAARD, T. S.; THIEL, S.; LIM, B. L.; JENSEN, T. V.; JUUL-MADSEN, H. R.; TAKAHASHI, A.; HAMANA, T.; KAWAKAMI, M.; JENSENIUS, J. C. Cloning and sequencing of a cDNA encoding chicken mannose binding lectin (MBL) and comparison with mammalian analogues. **Immunology**, v.93, p.421-430, 1998.

LIEW, H. C.; KHOO, H. E.; MOORE, P. K.; BHATIA, M.; LU, J.; MOOCHHALA, S. M. Synergism between hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) in vasorelaxation induced by stonustoxin (SNTX), a lethal and hypotensive protein factor isolated from stonefish *Synanceja horrida* venom. **Life Sciences**, v.80, p.1664-1668, 2007.

LOPES-FERREIRA, M.; BARBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v.36, p.405-410, 1998.

LOPES-FERREIRA, M.; MAGALHÃES, G. S.; FERNANDEZ, J. H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; LIMA, C.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Structural and biological characterization of nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v.93, p.971-980, 2011.

LOPES-FERREIRA, M.; GRUND, L. Z.; LIMA, C. *Thalassophryne nattereri* fish venom: from the envenoming to the understanding of the immune system. **The journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** (on line), v.20, p.1-12, 2014a.

LOPES-FERREIRA, M.; RAMOS, A. D.; MARTINS, I. A.; LIMA, C.; CONCEIÇÃO, K.; HADDAD, V. Jr. Clinical manifestations and experimental studies on the spine extract of the toadfish *Porichthys porosissimus*. **Toxicon**, v.86, p.28-39, 2014b.

LOW, K. S. Y.; GWEE, M. C. E.; YUEN, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KHOO, H. E. Stonustoxin: a highly potent endothelium-dependent vasorelaxant in the rat. **Toxicon**, v.31, p.1471-1478, 1993.

LOW, K. S. Y.; GWEE, M. C. E.; YUEN, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KHOO, H. E. Stonustoxin: effects on neuromuscular function *in vitro* and *in vivo*. **Toxicon**, v.32, p.573-581, 1994.

LU, Y.; ZHUANG, Y.; LIU, J. Mining antimicrobial peptides from small open reading frames in *Ciona intestinalis*. **Journal of Peptide Science**, v.20, p.25-29, 2014.

MACQUEEN, D. J.; JOHNSTON, I. A. Evolution of the multifaceted eukaryotic akirin gene family. **BMC Evolutionary Biology**, v.9, p.1-20, 2009.

MADOKORO, M.; UEDA, A.; KIRIAKE, A.; SHIOMI, K. Properties and cDNA cloning of a hyaluronidase from the stonefish *Synanceia verrucosa*. **Toxicon**, v.58, p.285-292, 2011.

MAGALHÃES, G. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; LOPES-FERREIRA, M.; LORENZINI, D. M.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v.88, p.693-699, 2006.

MARTIN, L. A.; SMITH, T. J.; OBERMOELLER, D.; BRUNER, B.; KRACKLAUER, M.; DHARMARAJ, S. RNA purification. In: GERSTEIN, A. S. (Ed.). *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*. 1 ed. Wiley-Liss, Inc., 2001, 528 p.

MEBS, D. *Venomous and Poisonous Animals*. 1. ed. Medpharm: Stuttgart, 2002. 340 p.

MEDZHITOV, R. C.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, p.295-298, 1997.

MENESTRINA, G.; MOSER, C.; PELLET, S.; WELCH, R. Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. **Toxicology**, v.87, p.249-267, 1994.

MÉNEZ, A. Les structures des toxines des animaux venimeux. **Pour la Science**, v.190, p.34-40, 1993.

MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. **Toxicon**, v.47, p.255-259, 2006.

MENEZES, T.N.; CARNIELLI, J. B. T.; GOMES, H. L.; PEREIRA, F. E. L.; LEMOS, E. M.; BISSOLI, N. S.; LOPES-FERREIRA, M.; ANDRICH, F.; FIGUEIREDO, S. G. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. **Toxicon**, v.60, p.4-11, 2012.

METZKER, M. L. Sequencing technologies – the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p.31-46, 2010.

MORVAN, C. L.; TROUDAUD, D.; DESCHAUX, P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.165–168, 1998.

MUNIR, S.; SINGH, S.; KAUR, K.; KAPUR, V. Suppression subtractive hybridization coupled with microarray analysis to examine differential expression of genes in virus infected cells. **Biological procedures online**, v.6, p.94-104, 2004.

NAGASAKA, K.; NAKAGAWA, H.; SATOH, F.; HOSOTANI, T.; YOKOIGAWA, K.; SAKAI, K. A novel cytotoxic protein, karatoxin, from the dorsal spines of the redfin velvetfish, *Hypodytes rubripinnis*. **Toxin Review**, v.28, p.260-265, 2009.

NAKAO, M.; YANO, T. Structural and functional identification of complement components of the bony fish carp (*Cyprinus carpio*). **Immunological Reviews**, v.166, p.27-38, 1998.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B. M.; SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; DA SILVA, A. R. B. P.; WALTER, M. E. M. T.; BRIGIDO, M. M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOSANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon**, v.53, p.427-436, 2009.

NELSON, J. S. *Fishes of the world*. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 1994. 600 p.

NG, H. C.; RANGANATHAN, S.; CHUA, K. L.; KHOO, H. E. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceia horrida*). **Gene**, v.346, p.71-81, 2005.

OGATA, H.; GOTO, S.; SATO, K.; FUJIBUCHI, W.; BONO, H.; KANEHISA, M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.29-34, 1999.

OGOSHI, M.; INOUE, K.; TAKEI, Y. Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, v.311, p.1072-1077, 2003.

OUANOUNOU, G.; MALO, M.; STINNAKRE, J.; KREGER, A. S.; MOLGÓ, J. Trachynilysin, a neurosecretory protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, forms nonselective pores in the membrane of NG108-15 cells. **The journal of biological chemistry**, v.277, p.39119-39127, 2002.

PAGE, R. D. M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Cabios Applications Note**, v.12, p.357-358, 1996.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Gene expression in *Echis carinatus* (Carpet viper) venom glands following milking. **Toxicon**, v.30, p.379-386, 1992.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.32, p.143-171, 2012.

PERFETTO, L.; GHERARDINI, P. F.; DAVEY, N. E.; DIELLA, F.; CITTERICH, M. H.; CESARENI, G. Exploring the diversity of SPRY/B30.2-mediated interactions. **Cell**, v.38, p.38-46, 2013.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, p.785-786, 2011.

PETTERSSON, E.; LUNDEBERG, J.; AHMADIAN, A. Generations of sequencing technologies. **Genomics**, v.93, p.105-111, 2009.

PIGAULT, C.; FOLLENIUS-WUND, A.; SCHMUTZ, M.; FREYSSINET, J. M.; BRISSON, A. Formation of two dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine containing liposomes. **Journal Molecular Biology**, v.236, p.199-208, 1994.

POH, C. H.; YUEN, R.; KHOO, H. E.; CHUNG, M.; GWEE, M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Purification and partial characterization of stonustoxin (lethal factor) from *Synanceia horrida* venom. **Comparative Biochemistry and Physiologic**, v.99B, p.793-798, 1991.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. *A vida dos Vertebrados* (The life of Vertebrates). 4 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008, 684p.

RAMOS, A. D.; CONCEIÇÃO, K.; ISMAEL, P.; RICHARDSON, M.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Specialization of the sting venom and skin mucus of *Cathorops spixii* reveals functional diversification of the toxins. **Toxicon**, v.59, p.651-665, 2012.

RENGASAMY, A.; JOHNS, R. A. Inhibition of nitric oxide synthase by a superoxide generating system. **Systemic Journal Pharmacological Experimental Therapeutics**, v.267, p.1024-1027, 1993.

RUSSELL, F. E. Marine toxins and venomous and poisonous marine animals. In: RUSSELL, F. S. *Advances in Marine Biology*. 2. ed. London: Academic Press, 1965, p.137-141.

RUSSELL, F. E. Venomous animal injuries. **Current Problems in Pediatrics**, v.3, p.1-47, 1973.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v.1-3.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Aca. Sci.**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, D. B.; KOMEAGAE, E. N.; FIGUEIREDO, S. G.; HADDAD Jr., V.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. **Toxicon**, v.51, p.585-596, 2008.

SATOH, F.; NAKAGAWA, H.; YAMADA, H.; NAGASAKA, K.; NAGASAKA, T.; ARAKI, Y.; TOMIHARA, Y.; NOZAKI, M.; SAKURABA, H.; OHSHIMA, T.; HATAKEYAMA, T.; AOYAGI, H. Fishing for bioactive substances from scorpionfish and some sea urchins. **Journal of Natural Toxins**, v.11, p.297-304, 2002.

SCHAEFFER C. S.; CARLSON, R. W.; RUSSEL, F. E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**, v.9, p.69-78, 1971.

SCHIFFER M.; EDMUNDSON, AB. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. **Biophysic Journal**, v.2, p.121-135, 1967.

SINGLETARY, E. M.; ROCHMAN, A. S.; BODMER, J. C. A.; HOLSTEGE, C. P. Envenomations. **The medical clinic of North America**, v.89, p.1195-1224, 2005.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1462, p.55-70, 1999.

SHI, Y.; ZHU, X. P.; YIN, J. K.; ZHANG, Q. Y., GUI, J. F. Identification and characterization of interferon regulatory factor-1 from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Molecular Biology Reports**, v.37, p.1483-1493, 2010.

SHINOHARA, G.; IMAMURA, H. Revisiting recent phylogenetic studies of "Scorpaeniformes". **Ichthyology Research**, v.54, p.92-99, 2007.

SHINOHARA, M., NAGASAKA, K., NAKAGAWA, H., EDO, K., SAKAI, H., KATO, K., IWAKI, F., OHURA, K., SAKURABA, H. A novel chemoattractant lectin, karatoxin, from the dorsal spines of the small scorpionfish *Hypodytes rubripinnis*. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.113, p.414-417, 2010.

SHIOMI, K.; TAKAMIYA, M.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T.; KONNO, K. Hemolytic, lethal and edema-forming activities of the skin secretion from the oriental catfish (*Plotosus lineatus*). **Toxicon**, v.24, p.1015-1018, 1986.

SHIOMI, K.; HOSAKA, M.; YAMANAKA, H., KIKUCHI, T. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. **Marine Biology**, v.103, p.285-289, 1989.

SHIOMI, K.; HOSAKA, M.; KITUCHI, T. Properties of a lethal factor in stonefish *Synanceia verrucosa* venom. **Nippon Suis Gakk**, v.59, p.1099-1103, 1993.

SMEETS, K.; DAMME, E. J. M. V.; VERHAERT, P.; BARRE, A.; ROUGE, P.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation, characterization and molecular cloning of the mannose binding lectins from leaves and roots of garlic (*Allium sativum*). **Plant Molecular Biology**, v.33, p.223-234, 1997.

SMITH, W. L.; WHEELER, W. C. Venom evolution widespread in fishes: A phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. **Journal of Heredity**, v.97, p.206-217, 2006.

SOSA-ROSALES, J. I.; PIRAN-SOARES, A. A.; FARSKY, S. H.; TAKEHARA, H. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. **Toxicon**, v.45, p.155-161, 2005.

SOPRANI, J. Avaliação do efeito antitumoral de um polipeptídeo isolado da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* e avaliação do seu potencial uso no diagnóstico de tumores (MSc Dissertation) Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2008.

SRI BALASUBASHINI, M.; KARTHIGAYAN, S.; SOMASUNDARAM, S. T.; BALASUBRAMANIAN, T.; RUKKUMANI, R.; MENON, V. P. FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. **Journal of carcinogenesis**, v.5, p.27-35, 2006.

SUNG, J. M. L.; LOW, K. S. Y.; KHOO, H. E. Characterization of the mechanism underlying stonustoxin-mediated relaxant response in the rat aorta *in vitro*. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.1113-1118, 2002.

SUZUKI, Y.; TASUMI, S.; TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; SUETAKE, H. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.136, p.723-730, 2003.

THANH, T.; CHI, V. T.; ABDULLAH, M. P.; OMAR, H. Omar; NOROOZI, M. K. H.; NAPIS, S. Construction of cDNA library and preliminary analysis of expressed sequence tags from green microalga *Ankistrodesmus convolutes*. **Corda Molecular Biology Reports**, v.38, p.177-182, 2011.

THEAKSTON, R. D.; KAMIGUTI, A. S. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. **Toxicon**, v.40, p.579–651, 2002.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TSUTSUI, A.; TAKAHASHI, R.; SUMIDA, T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v.4, p.364-367, 2005.

TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y. Lectins homologous to those of monocotyledonous plants in the skin mucus and intestine of Pufferfish, *Fugu rubripes*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.20882-20889, 2003.

TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Novel mannose specific lectins found in torafugu (*Takifugu rubripes*): a review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D**, v.1, p.122-127, 2006a.

TSUTSUI, S.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Carbohydrate binding site of a novel mannose specific lectin from fugu (*Takifugu rubripes*) skin mucus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.143, 514-519, 2006b.

TUAN, R. S.; FITZPATRICK, D. F. Alkaline phosphatase conjugated protein A as a sensitive reagent to immunoscreen an expression cDNA plasmid library: Isolation of cDNA to the calcium-binding protein of the chick embryonic chorionallantoic membrane. **Analytical Biochemistry**, v.159, p.329-335, 1986.

TURNER, M. W. Mannose binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, v.17, p.532-540, 1996.

UEDA, A.; SUZUKI, M.; HONMA, T.; NAGAI, H.; NAGASHIMA, Y.; SHIOMI, K. Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1760, p.1713-1722, 2006.

VITVED, L.; HOLMSKOV, U.; KOCH, C.; EISNER, B.; HANSEN, S.; SKOLT, K. The homologue of mannose binding lectin in the carp family Cyprinid is expressed at high level in spleen and the deduced primary structure predicts affinity for galactose. **Immunogenetics**, v.51, p.955-964, 2000.

WELCH, W. J. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. **Current Opinion in Cell Biology**, v.3, p.1033-1038, 1991.

WHITE, J. CSL Antivenom Handbook. Melbourne: Commonwealth Serum Laboratories Ltd, 1995.

WILLIAMSON, J. A.; FENNER, P. J.; BURNETT, J. W. *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*. Sydney: University of New South Wales Press, 1996. 504 p.

WOO, J-S.; IMM, J-H.; MIN, C-K.; KIM, K-J.; CHA, S-S.; OH, B-H. Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. **The EMBO Journal**, v.25, p.1353-1363, 2006.

YANG, G.P.; ROSS, D. T.; KUANG, W. W.; BROWN, P. O.; WEIGEL, R. J. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.1517-1523, 1999.

YANG, X.; XIA, J.; YU, Z.; HU, Y.; LI, F.; MENG, H.; YANG, S.; LIU, J.; WANG, H. Characterization of diverse antimicrobial peptides in skin secretions of Chungang torrent frog *Amolops chunganensis*. **Peptides**, v.38, p.41-53, 2012.

YANG, X.; WANG, Y.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. **Toxicon**, v.74, p.151-157, 2013.

YEAMAN, M. R.; GANK, K. D.; BAYER, A. S.; BRASS, E. P. Synthetic peptides that exert antimicrobial activities in whole blood and blood-derived matrices. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3883-3891, 2002.

YEW, W. S.; KHOO, H. E. The role of tryptophan residues in the hemolytic activity of stonustoxin, a lethal factor from stonefish (*Synanceia horrida*) venom. **Biochimie**, v.82, p.251-257, 2000.

YEW, W. S.; KOLATKAR, P. R.; KUHN, P; KHOO, H. E. Crystallization and preliminary crystallographic study of stonustoxin, a protein lethal factor isolated from the stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **Journal of Structural Biology**, v.128, p.216-218; 1999.

YUEN, R.; CAI, B.; KHOO, H. E. Production and characterization of monoclonal antibodies against stonustoxin from *Synanceja horrida*. **Toxicon**, v.33, p.1557-1564, 1995.

ZHANG, B.; LIU, Q.; YIN, W.; ZHANG, X.; HUANG, Y.; LUO, Y.; QIU, P.; SU, X.; YU, J.; HU, S.;YAN, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v.7:152, 2006.

APÊNDICE I - Screening da biblioteca de cDNAs com sondas radioativas marcadas com dCTP [α - ^{32} P]

Fragmentos de cDNAs amplificados por PCR e correspondentes a regiões internas da subunidade α e β foram utilizados para construir sondas radioativas marcadas com dCTP, [α - ^{32} P] de fragmentos putativos das subunidades α e β para screening de aproximadamente 10.000 clones. O procedimento realizado para a marcação se encontra descrito na seção Métodos: 2.10.: “Preparações de sondas de DNA marcadas com dCTP [α - ^{32} P]”. A figura 46 mostra os fragmentos de cDNAs amplificados por PCR e as respectivas sondas radioativas reveladas após 30 min. de exposição em -80°C .

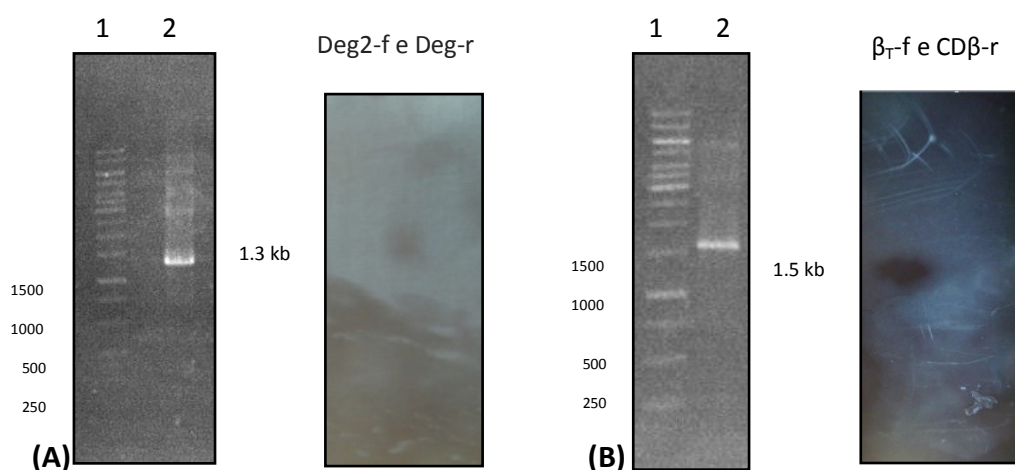


Figura 46: Géis de agarose 1% e sondas radioativas marcadas com dCTP, [α - ^{32} P] de fragmentos putativos das subunidades α e β de *S. plumieri*. (A): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- Deg2-f e Deg-r (subunidade α). (B): 1- 1 kb DNA Ladder; 2- β_T -f e CD β -r (subunidade β).

O clone da subunidade α (1.367 bp) foi obtido após amplificação com os primers (Deg2-f e Deg-r) utilizando uma preparação de cDNA. Logo após a purificação do DNA em colunas GFX, o fragmento foi clonado em pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA (resultados apresentados na seção 3.8.1.: “Identificação, construção quimérica e propriedades de SpTx- α de *S. plumieri*”).

A clonagem desse fragmento (Figura 46A) resultou na presença de um inserto, o qual após sequenciamento e edição foi analisado através do BLASTn. A região traduzida do consenso produziu uma ORF de 455 aminoácidos que alinhou com 71% de identidade com a toxina descrita em *Pterois lunulata* e correspondente às posições 148-587 da subunidade α . Enquanto que, o clone da subunidade β utilizado para a construção da sonda foi obtido diretamente da biblioteca fagemidial após amplificação com os primers β_T -f e CD β -r (Figura 46B), como descrito no item 3.7.: “Screening da biblioteca de cDNAs pelo método de PCR”.

Para a análise com essas duas sondas, a biblioteca de bacteriófagos foi excisada e os fagemídeos crescidos em placas SOLR na presença de ampicilina (100 μ g/mL). Após a transferência das réplicas das colônias para membranas de nitrocelulose HATF ou de Nylon HybondTM-N⁺ e imobilização do DNA das células, os filtros foram hibridizados utilizando cada sonda radioativa separadamente, em experimentos independentes e na presença de formamida como descrito em na seção 2.10.2. “Screening da biblioteca de cDNAs com sondas radioativas marcadas com dCTP [α -³²P]”.

Após o screening autoradiográfico das colônias foram isolados 127 clones independentes que mostraram hibridização com uma das sondas radioativas (α ou β). O DNA plasmidial das colônias foi purificado pelo método de lise alcalina. A presença de inserto de DNA nos clones foi confirmada por digestão com enzima *EcoR* I e visualizados por eletroforese em agarose previamente ao sequenciamento do DNA.

O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando primers M13, as sequências de baixa qualidade foram removidas com o auxílio do programa da Applied Sequence Scanner v1.0 e as sequências foram editadas para formato Fasta. Após a edição, os insertos foram analisados com o auxílio do BLASTn e incluídos como ESTs para análises adicionais. A figura 47 mostra um gráfico de barras do perfil da distribuição do tamanho das ESTs sequenciadas, que foram: 0.2-0.5 kb (52%), 0.5-1.0 kb (40,1%) e 1.0-2.0 kb (7,9%). Como é observado nesta figura, a distribuição das ESTs no screening com radioativo prevaleceram insertos de tamanhos que variaram de 200-500 bp.

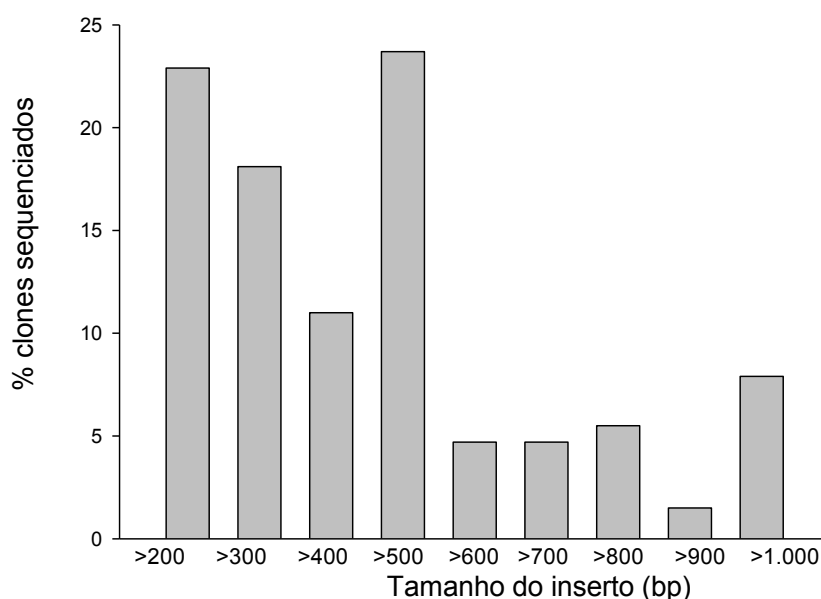


Figura 47: Distribuição do tamanho dos insertos sequenciados após screening com o uso de radioativo. O intervalo das ESTs variou entre 200-1.000 bp.

A figura 48 mostra a distribuição das ESTs obtidas pelo screening com sondas radioativas. Os dados revelam novamente um número significativo e similar de sequências desconhecidas pelo banco de dados (N= 30, 24%). Em relação à categoria de proteínas regulatórias (N= 15, 12%) e os grupos formados por sequências hipotéticas e proteínas estruturais e de motilidade totalizaram (N= 20, 7-8%). Genes envolvidos na síntese de proteínas e processamento e proteínas relacionadas ao metabolismo celular perfizeram (N= 26, 20%).

Em relação à categoria formada por proteínas sinalizadoras, um total de (N= 36, 28%) clones foram identificados. Interessantemente, 20% desses clones alinharam com lectinas de ovos de peixes e mostraram alta similaridade com aqueles já isolados pelos métodos de screening randômico e com anticorpos, como mostrado anteriormente, confirmando a identidade e alta prevalência de lectinas na biblioteca de cDNAs de *S. plumieri*.

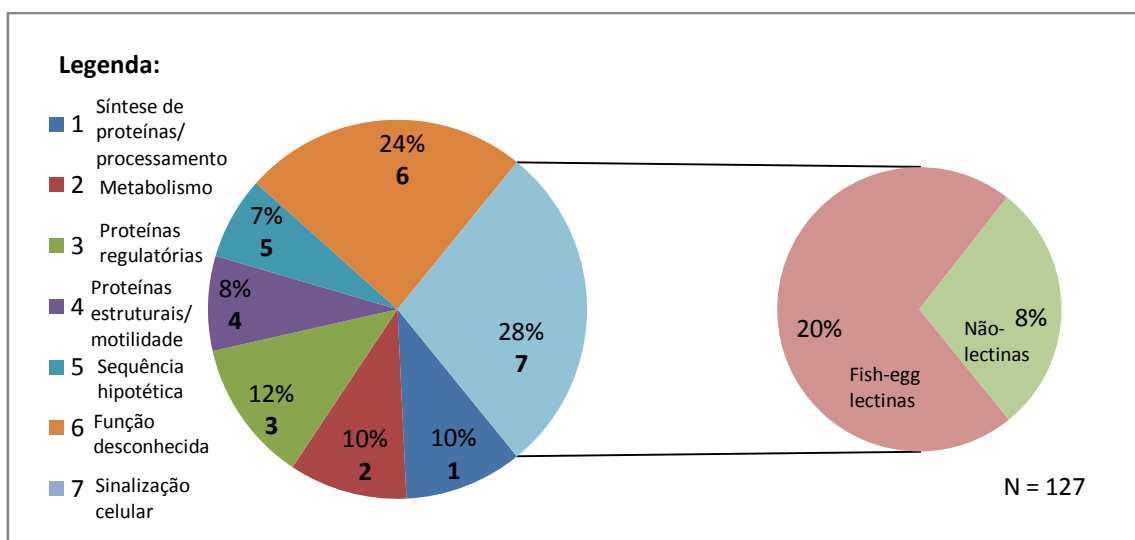


Figura 48: Classificação de ESTs após screening com radioativo da biblioteca de *S. plumieri* baseado em suas semelhanças com funções descritas no BLASTn. Proporção relativa de cada categoria: **(1):** “Síntese de proteínas/ processamento” contêm transcritos que codificam proteínas ribossomais e de tradução; **(2):** “Metabolismo” contêm transcritos de proteínas presentes em mitocôndrias; enzimas do citosol, de fosforilação e processos oxidativos; **(3):** “Proteínas regulatórias” contêm genes que codificam fatores de transcrição e proteínas da regulação gênica; **(4):** “Proteínas estruturais/motilidade” incluem proteínas do citoesqueleto e componentes da matriz extracelular; **(5):** “Sequência hipotética” incluem ESTs preditas como proteínas hipotéticas; **(6):** “Função desconhecida” contêm todas aquelas ESTs cujas sequências não foram encontradas no banco de dados; **(7):** “Sinalização celular” compreende proteínas de ligação, tráfico intracelular ou proteínas sinalizadoras.

Durante o screening com sondas radioativas, foram selecionadas 67 ESTs com forte similaridade e scores ≥ 80 quando pesquisadas no banco de dados BLASTn. A tabela 26 mostra a lista representativa do alinhamento obtido com as sequências de nucleotídeos e o número de acesso do GeneBank para cada entrada.

Tabela 26: Lista representativa de ESTs matches com BLASTn de clones obtidos após screening com radioativo da biblioteca de *S. plumieri* ($\leq 10^{-10}$, score ≥ 80).

Grupo	HIT ID	E-value (score)	Identidade	Nº de ESTs
Metabolismo				
	XM005922215.1	1e-180 (641)	ADP/ATP translocase 2-like	1
	DQ341376.1	4e-116 (428)	p22phox	3
	JQ681859.1	3e-51 (211)	Cytochrome b	1
Estrutural/Motilidade				
	DQ324363.1	0.0 (1258)	Collagen, type 1, alpha 1	5
	XM005944820.1	0.0 (656)	Keratin type II cytoskeletal 5-like	1
	AB045975.1	2e-89 (339)	Pro-alpha 1 type V/XI collagen	1
	XM004559482.1	1e-61 (246)	Peripheral myelin protein 22-like	2
	XM004539248.1	6e-20 (107)	Myosin-9-like	1
	FJ438511.1	2e-15 (91.6)	Cytokeratin	1
Sinalização celular				
	KC513785.1	1e-140 (508)	Elongation factor 1-alpha	1
	XM004543212.2	5e-94 (432)	Cleavage and polyadenylation specificity factor	1
	AB618145.1	3e-51 (298)	Fish-egg lectin	26
	JN986720.1	1e-69 (273)	MDA5 gene	2
	XM003442283.2	1e-45 (193)	ADM-like	1
	JX171697.1	3e-13 (166)	MHC class Ia antigen	2
	XM006796040.1	1e-27 (134)	GRB2-associated-binding protein 1-like	1
	JQ780820.1	2e-10 (128)	Akirin 2	2
Regulatórias				
	FJ644278.1	0.0 (1572)	Heat Shock protein 90	1
	JN540029.1	0.0 (957)	Activated protein kinase C	1
	JN828577.1	1e-40 (682)	Antifreeze glycoprotein	2
	XM006786623.1	2e-132 (481)	Cold-inducible RNA-binding protein A-like	1
	XM004568075.1	4e-116 (427)	Double-strand-break repair protein rad21	1
	JF440969.1	1e-85 (326)	Krueppel-like factor 6	1
	AJ605083.1	5e-59 (237)	Aryl hydrocarbon receptor repressor	2
	BT082582.1	5e-44 (187)	Proteasome subunit alpha type-3	1
	AY522642.1	1e-15 (159)	Thymosin beta a-like	4
Toxinas				
	XM006798224.1	5e-39 (171)	Hemolytic toxin Avt-1-like	1

Essa lista ordenada em categorias contém 17 (25%) cópias únicas e 50 (75%) correspondendo a duas ou mais cópias identificadas na biblioteca. ESTs categorizadas no grupo “Metabolismo” tiveram valores de E-value e score que variaram entre 1e-180 (641) e 3e-51 (211), enquanto que o grupo “Estrutural/Motilidade” variou entre 0.0 (1258) e 2e-15 (91.6) e o grupo “Sinalização celular” variou entre 1e-140 (508) e 2e-10 (128). Por fim, o grupo “Regulatórias” variou entre 0.0 (1572) e 1e-15 (159).

Do total de clones sequenciados, 26 (20%) das ESTs apresentaram fortes matches (score > 401), enquanto que 23 (18%) tiveram matches com scores entre 201-400 e 42 (33%) com scores entre 80-200. ESTs que não tiveram matches ou foram menores que 80 totalizaram 36 (29%).

Os ensaios de hibridização com as sondas radioativas sintetizadas com primers desenhados para as subunidades α ou β não identificaram as toxinas de *S. plumieri*, como era esperado. Entretanto, foi identificado um EST de 300 bp que alinhou (E-value = 5×10^{-39}) com a toxina hemolítica Avt-1-like de *Neolamprologus brichardi*. Análises desta sequência revelaram a presença de cinco ORFs sucessivas e idênticas constituídas cada uma por um peptídeo com 20 resíduos de aminoácidos (Figura 49) que alinhou com a região C-terminal da citolisina hemolítica de *Oreochromis niloticus* de outros peixes, além de mostrar homologia com peptídeos citotóxicos de anêmonas do mar.

<i>Scorpaena plumieri</i>	TMFAIGKAIVKLELYDRLGH
<i>Neolamprologus brichardi</i>	TMSTVGKAMVKVELYDKMGH 177
<i>Maylandia zebra</i>	TMSTVGKAMVKVELYDKMGH 177
<i>Oreochromis niloticus</i>	TMSTVGKAMVKLELYDKMGH 177
<i>Danio rerio</i>	TMSTVGKAILKLEVYDKMG- 177
	** : : * : : * : * : * : * : *

Figura 49: Alinhamento da EST de *S. plumieri* com toxina hemolítica Avt-1-like utilizando a base de dados BLASTx e ClustalW2. A sequência consenso (300 bp) obtida durante o screening com sondas radioativas produziu uma ORF de 20 resíduos que alinhou com a região C-terminal da toxina hemolítica Avt-1-like de peixes. As posições de aminoácidos à direita são referentes a outras toxinas hemolíticas. *identifica resíduos idênticos; : identifica um resíduo conservado. Número de acesso (DDBJ/EMBL/GeneBank nucleotide sequence databases): Toxina hemolítica Avt-1-like de *Neolamprologus brichardi*, XP006798287.1; Toxina hemolítica Avt-1-like de *Maylandia zebra*, XP004552327.1; Toxina hemolítica Avt-1-like de *Oreochromis niloticus*, XP005468889.1; Equinatoxina-4-like de *Danio rerio*, XP003198166.1.

ANEXO I - Expressed sequence tags in venomous tissue of *Scorpaena plumieri* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae)