

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Expressão Heteróloga e Purificação da
Tityustoxina: Obtenção da proteína
recombinante Ts3 do escorpião *Tityus
serrulatus***

ORIENTADO: Anderson Oliveira do Carmo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE

Fevereiro - 2011

Anderson Oliveira do Carmo

**Expressão Heteróloga e Purificação da
Tityustoxina: Obtenção da proteína recombinante Ts3
do escorpião *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada ao curso de
mestrado em Genética do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais com requisito
parcial para obtenção de título de
Mestre em Genética

Orientador: Prof.Dr. Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Genética
Belo Horizonte, Fevereiro de 2011

Á minha família e a todos que
contribuíram para a conclusão
deste trabalho.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram comigo durante o período de realização do meu curso de Mestrado.

Ao programa de Programa de Pós-Graduação em Genética, todos os professores e alunos, aos quais tive a oportunidade de conviver neste período.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Evanguedes Kalapotahakis gostaria de agradecer a oportunidade única de ter me orientado. Nesse período aprendi muito, não só sobre pesquisa e meio acadêmico, mas também muitos valores.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, que estão presentes hoje ou que já passaram por lá um dia e que fizeram com que a rotina e os experimentos fossem muito agradáveis, Ana Paula, Bárbara Leal, Bárbara Freitas, Arthur, Higgor, Ana Luiza, Gabriel, Flávia Dias, Ana Carolina (PUC), Cibele, Tatiana, Luiz Felipe, Cleide, Denise, Isabella, Susane, Egian, Camila, Patrícia, Kelly, Marcelo, Érika, Valéria Lucilânia e Débora.

E em especial agradeço a Thaís Mendes e Carolina Campolina por terem me ensinado muito. Marcele Prazeres pela ajuda em todas as horas, Flávia Siqueira pela força na formatação da dissertação, além do André companheiro de iniciação e grande amigo.

A todos os amigos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, com destaque a Clara Duarte que me deu grande apoio durante meu projeto.

A minha família, especialmente aos meus pais grandes incentivadores da minha busca pelo conhecimento. Também meus irmãos Eduardo pela tolerância e ajuda e Nathália pela ajuda na correção e formatação de meu trabalho. Aos primos, por várias conversas e incentivos. A vó Divina e Tia Ereni pela torcida constante.

Aos meus colegas de graduação que permaneceram amigos Cynthia, Felipe, Daniel e Marina. E aos meus grandes amigos Bruno, Tinê, Magno, Izinara, Décio e especial ao Alexandre que sempre me incentivou a nunca desistir.

Esta dissertação também tem participação de todos vocês.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIações.....	X
1. RESUMO	12
2. ABSTRACT.....	13
3. INTRODUÇÃO	14
3.1 Os Escorpiões.....	14
3.2 <i>Tityus serrulatus</i>	16
3.3 Veneno dos Escorpiões e Toxinas	18
3.4 Veneno de <i>T. serrulatus</i> e sua nomenclatura	22
3.5 A Toxina Ts3	25
3.6 Escorpionismo e epidemiologia no Brasil	27
3.6.1 Quadro clínico e tratamento	29
4. JUSTIFICATIVA	31
5. OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivos Gerais.....	33
5.2 Objetivos Específicos.....	33
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
6.1 Animais Utilizados e Genótipo das Linhagens de <i>E. coli</i>	34
6.2 Obtenção do clone de cDNA correspondente à ORF da Ts3	34
6.3 Seleção dos Vetores Bacterianos	34
6.4 Seleção das Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	39
6.5 Inserção de adaptadores a sequência da Ts3 por PCR.....	39
6.6 Resolução Eletroforética em Gel de Agarose.....	40
6.7 Purificação de DNA a partir de gel de Agarose.....	41
6.8 Subclonagem do Produto de PCR da Ts3 ao vetor PCR 2.1 TOPO	41
6.9 Preparação de células eletrocompetentes	42
6.10 Eletrotransformação Bacteriana	42
6.11 PCR de Colônia.....	43
6.12 Extração Plasmidial por Lise Alcalina.....	44
6.13 Quantificação do DNA Plasmidial.....	45
6.14 Reação de Sequenciamento	45
6.15 Análises das sequências obtidas.....	46

6.16	<i>Digestão com Enzimas de Restrição</i>	46
6.17	<i>Ligação ORF da Ts3 aos Vetores pET 26b e pET 32c</i>	46
6.18	<i>Expressão piloto da Ts3</i>	47
6.19	<i>Resolução Eletroforética SDS-PAGE</i>	48
6.20	<i>Lise de Choque Osmótico</i>	48
6.21	<i>Lise para purificação com coluna de Níquel em condições não desnaturantes</i>	49
6.22	<i>Teste de solubilidade da Ts3 recombinante</i>	49
6.23	<i>Purificação da Ts3 em Condições Nativas com Resina de Níquel</i>	49
6.24	<i>Digestão da Ts3 purificada com Enteroquinase</i>	50
6.25	<i>Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford</i>	50
6.26	<i>Imunização de Coelhos com Ts3 expressa em pET 26b</i>	51
6.27	<i>Sangria dos Coelhos</i>	52
6.28	<i>Preparação do Soro dos Coelhos</i>	52
6.29	<i>ELISA</i>	52
6.30	<i>Western Blot</i>	53
6.31	<i>Determinação da DL_{50}</i>	53
6.32	<i>Teste Toxicidade da Ts3 em Camundongos</i>	54
6.33	<i>Ensaio de neutralização</i>	54
6.34	<i>SPOT</i>	54
7.	RESULTADOS	57
7.1	<i>PCR para inserção de adaptadores</i>	57
7.2	<i>Clonagem da ORF da Ts3 no vetor pCR 2.1 TOPO</i>	58
7.3	<i>Sequenciamento da ligação da ORF da Ts3 ao vetor pCR 2.1 TOPO</i>	58
7.4	<i>Digestão do vetor pCR/Ts3 e dos vetores pET-26b e pET-32c</i>	60
7.5	<i>Purificação da banda correspondente a ORF da Ts3 e vetores de expressão em gel de agarose</i>	61
7.6	<i>Clonagem da ORF da Ts3 nos vetores de expressão</i>	62
7.6.1	<i>pET-26b</i>	62
7.6.2	<i>pET-32c</i>	62
7.7	<i>Sequenciamento dos clones de Ts3 nos vetores de expressão</i>	63
7.8	<i>Expressão</i>	66
7.8.1	<i>Expressão da pET26/Ts3</i>	66
7.8.2	<i>Expressão da pET32/Ts3</i>	69
7.9	<i>Solubilidade da Ts3 recombinante</i>	71
7.10	<i>Purificação da Ts3 recombinante</i>	72
7.10.1	<i>pET26/Ts3</i>	72
7.10.2	<i>pET32/Ts3</i>	73
7.11	<i>Corte com enteroquinase</i>	73
7.12	<i>Titulação dos soros</i>	74

7.12.1	Soro anti-pET26/Ts3	74
7.12.2	Soro anti-veneno bruto de <i>T. serrulatus</i>	75
7.13	ELISA	76
7.14	Western Blot.....	77
7.15	Determinação da DL_{50}	78
7.16	Teste de Toxicidade da Ts3 recombinante	79
7.17	Ensaio de Neutralização	79
7.18	SPOT.....	80
8.	DISCUSSÃO	84
8.1	Perspectivas	91
9.	CONCLUSÃO	92
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação esquemática da morfologia do escorpião.	15
Figura 2: <i>Tityus serrulatus</i> em vista dorsal.	16
Figura 3: Mapa de distribuição geográfica de <i>Tityus serrulatus</i>	17
Figura 4: Conformação tridimensional da Ts3.	26
Figura 5: Mapa do vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO.	35
Figura 6: Mapa do vetor de expressão pET-26b.	37
Figura 7: Mapa do vetor de expressão pET-32c.	38
Figura 8: PCR para inserção de adaptadores a ORF da Ts3.	57
Figura 9: PCR de colônia para confirmação da ligação da ORF da Ts3 em pCR 2.1 TOPO.	58
Figura 10: Sequenciamento do vetor pCR2.1 TOPO contendo a ORF da Ts3.	59
Figura 11: Alinhamento da Ts3 clonada no vetor pCR/Ts3 pelo Blastn.	59
Figura 12: Digestão com as endonucleases de restrição NcoI e XhoI do vetor pCR/Ts3.	60
Figura 13: Digestão com endonucleases de restrição dos vetores pET-26b e pET-32c.	61
Figura 14: PCR de colônia dos clones obtidos após transformação da ligação pET26/Ts3.	62
Figura 15: PCR de colônia dos clones obtidos após transformação da ligação pET32/Ts3.	63
Figura 16: Resultado do sequenciamento do vetor pET26/Ts3.	64
Figura 17: Resultado do sequenciamento do vetor pET32/Ts3.	65
Figura 18: Teste de melhores condições de expressão da pET26/Ts3.	68
Figura 19: Expressão de 4 colônias de Origami pET26/Ts3 em ausência de IPTG.	69
Figura 20: Teste das melhores condições de expressão da pET32/Ts3.	70
Figura 21: Ensaio de solubilidade da pET26/Ts3.	71
Figura 22: Ensaio de solubilidade da pET32/Ts3.	72
Figura 23: Purificação em condição não desnaturante da pET26/Ts3 expressa em Origami.	72
Figura 24: Purificação em condição não desnaturante da pET32/Ts3 expressa em Origami.	73
Figura 25: SDS-PAGE do corte da pET32/Ts3 com Enteroquinase.	74
Figura 26: Titulação do soro anti-pET26/Ts3.	75
Figura 27: Titulação do soro anti-veneno bruto de <i>T. serrulatus</i>	76
Figura 28: Elisa com Ts3 recombinante, Ts3 nativa e veneno bruto.	77
Figura 29: Western Blot com o extrato protéico bacteriano da expressão da Ts3.	78
Figura 30: Membrana de SPOT com os epítomos lineares das principais toxinas de <i>T. serrulatus</i>	81
Figura 31: Reatividade dos epítomos em relação aos soros testados por toxina.	83

Lista de Tabelas

Tabela 1: Nomenclatura das toxinas de <i>Tityus serrulatus</i> . *	25
Tabela 2: Escorpionismo no Brasil, acidentes e óbitos*	28
Tabela 3: Quadro clínico e tratamento dos acidentes escorpionicos*	30
Tabela 4: Iniciadores utilizados para a inserção de adaptadores a ORF da Ts3.	40
Tabela 5: Sequencias dos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento.	45
Tabela 6: Reação de ligação da ORF da Ts3 aos vetores pET26-b e pET-32c	47
Tabela 7: Imunização dos coelhos	51
Tabela 8: Doses de veneno para a determinação da DL ₅₀	54
Tabela 9: Mapa dos epítopos representados na membrana de SPOT	55
Tabela 10: Determinação da DL ₅₀ para o veneno bruto de <i>T. serrulatus</i>	78
Tabela 11: Teste de toxicidade da Ts3 recombinante.	79
Tabela 12: Ensaio de neutralização com soro anti-pET26/Ts3.	80

Lista de Abreviações

°C	Graus Celsius
Amp	Ampicilina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovino
Cols.	Colaboradores
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DL ₅₀	Dose letal para 50% da população
DNA	Ácido dexosirribonucléico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato
OD	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
Kb	Quilobase
KDa	Quilo Dalton
LacY1	Gene que codifica a permease
LacZ	Gene que codifica a β-galactosidase
Lb	Meio de Cultura Luria-Bertani
M	Molar
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
mM	Mili-Molar
mg	Mili-grama
mL	Mililitro
μF	microFaraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal
ng	Nanograma
Ω	Ohms
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
ORF	Open reading frame (fase de leitura aberta)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogenionte
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	Tampão salina fosfato Tween 20
PMSF	<i>Phenilmetilsulfonil fluoride</i>
PSA	Persulfato de Amônia
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
Swiss prot	Protein knowledgebase of Swiss Institute
T4 DNA ligase	DNA ligase do bacteriófago
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

Taq DNA pol.	DNA polimerase termoestável do <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TsNTxP	<i>Tityus serrulatus non-toxic protein</i>
Ts1	Toxina γ , principal β toxina do veneno de <i>T. serrulatus</i>
Ts2	Toxina II, outra toxina β do veneno de <i>T. serrulatus</i>
Ts3	<i>Tityustoxina</i> , a principal α -toxina do veneno de <i>T. serrulatus</i>
U	Unidade de enzima
U.V.	Ultra Violeta
V	Volts

1. Resumo

O escorpião *Tityus serrulatus* é a espécie brasileira que possui o veneno mais tóxico e causa elevado número de acidentes, principalmente em áreas urbanas, podendo levar a óbitos crianças e idosos. O tratamento dos casos mais graves consiste em soroterapia, porém este método possui alguns problemas como a obtenção de veneno bruto, manutenção dos cavalos imunizados e baixa sobrevivência destes após imunização. Uma alternativa para a solução destes problemas é a expressão heteróloga das principais toxinas em *Escherichia coli*. Desta maneira, objetivou-se a expressão heteróloga da toxina Ts3 de *T. serrulatus* sem toxicidade para a produção de soro. A sequência nucleotídica da Ts3 madura foi amplificada e clonada nos vetores de expressão bacteriana pET26b e pET32c. Após a clonagem, os vetores pET26/Ts3 pET32/Ts3e foram expressos em *E. coli* Origami (DE3), C41 (DE3) e C43 (De3) e a Ts3 recombinante expressada pelo vetor pET26b/Ts3 foi purificada através de uma resina de níquel. Após a purificação, os coelhos foram imunizados com a Ts3 recombinante, após seis doses de Ts3 recombinante foi aplicada uma dose de veneno bruto de *T. serrulatus*. O soro anti-Ts3 recombinante foi caracterizado por ELISA e SPOT. A Ts3 recombinante não apresentou nenhuma atividade farmacológica em injeção subcutânea em camundongos. O soro anti-Ts3 recombinante apresentou reconhecimento razoável ao veneno bruto por ELISA e o soro anti-Ts3 recombinante com apenas uma dose de veneno obteve aumento de seu reconhecimento. O SPOT revelou maior presença de anticorpos que reconhecem a porção C-terminal desta toxina. O soro anti-Ts3 recombinante não foi capaz de neutralizar o veneno, porém o soro anti-Ts3 recombinante com uma dose de veneno neutralizou 2DL₅₀. O baixo desempenho na neutralização pode estar relacionado a uma conformação inadequada da Ts3 recombinante que não gerou a produção de anticorpos neutralizantes. O uso de toxinas recombinantes na produção de soro necessita de aperfeiçoamento, porém os resultados obtidos mostram que este é um método promissor para a produção de soro antiescorpiônico.

2. Abstract

The scorpion *Tityus serrulatus* is a Brazilian species that has the most toxic venom and causes high number of accidents, especially in urban areas, and may lead to deaths in children and the elderly. The treatment of severe cases consists of serum therapy, but this method has some problems, such as obtaining the crude venom, maintenance of horse's immunized and poor survival of these animals after such immunization. An alternative to solve these problems is the heterologous expression of the main toxins in *Escherichia coli*. Thus, the goal of this work was to obtain the heterologous expression of Ts3 toxin of *T. serrulatus* without toxicity for serum production. The nucleotide sequence of the mature Ts3 was amplified and cloned in bacterial expression vectors pET26b and pET32c. After cloning, the vectors pET26/Ts3 and pET32/Ts3 were expressed in *E. coli* Origami (DE3), C41 (DE3) and C43 (DE3). Recombinant Ts3 produced by pET26b/Ts3 vector was purified using a nickel resin. After purification, rabbits were immunized with recombinant Ts3. After six boosters of recombinant Ts3, *T. serrulatus* crude venom was applied in the last booster. The anti-recombinant Ts3 serum was characterized by ELISA and SPOT. Recombinant Ts3 showed no pharmacological activity when injected subcutaneously in mice. The anti-recombinant Ts3 serum showed a reasonable recognition of the crude venom by ELISA and, with only one booster of crude venom, this recognition increased. SPOT revealed increased presence of antibodies that recognize the C-terminal portion of this toxin. Anti-recombinant Ts3 serum was unable to neutralize the venom, but the serum with one booster of crude venom neutralized 2DL₅₀. The low performance in the neutralization may be related to an inadequate conformation of recombinant Ts3 generating poor neutralizing antibodies. The use of recombinant toxins in the serum production needs improvement, but the results show that this is a promising method for the production of anti-venom serum.

3. Introdução

3.1 Os Escorpiões

Os escorpiões estão presentes na Terra a cerca de 400 milhões de anos e foram os primeiros artrópodes que colonizaram o ambiente terrestre. Estes animais mantêm o mesmo padrão morfológico sem grandes alterações desde os primeiros fósseis encontrados, mostrando alta adaptabilidade aos ambientes que habitam. Desde as primeiras populações humanas os escorpiões são conhecidos e estão presentes como parte de mitos e lendas em diversas culturas como a grega e a egípcia. Estes povos retratam estes animais em desenhos e obras artísticas, com forte ligação ao perigo e ao mal (Polis, 1990). Os escorpiões estão amplamente distribuídos pela superfície da terra, colonizando todos os continentes com exceção da antártica e áreas polares. Estando presentes principalmente em regiões tropicais (Lourenço, 1988; Sissom, 1990; Polis, 1990).

Existem em todo o mundo cerca de 1.500 espécies de escorpiões. Estão classificados dentro da classe Arachnida, ordem Scorpionidae e estão distribuídos entre nove famílias. A única família que possui representantes que conferem real perigo em acidentes a humanos é a Buthidae, esta família também possui o maior número de espécies, (cerca de 500) distribuídas entre 48 gêneros (Raz *et. al.*, 2009). Dentro da família Buthidae, apenas 25 espécies representam riscos graves (incluindo óbitos) quando envolvidos em acidentes com humanos (Polis, 1990). No Brasil o gênero *Tityus* possui cinco representantes perigosos da família Buthidae, sendo eles: *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. cambridgei* e *T. trivittatus*.

A morfologia destes animais é dividida em duas regiões principais: prossoma e opistossoma. O prossoma compreende o cefalotórax e apêndices (um par de quelíceras, um par de palpos quelados e quatro pares de patas). Já o opistossoma compreende o abdômen, que por sua vez é subdividido em mesossoma que compreende oito segmentos largos localizados posteriormente ao prossoma, enquanto o metassoma compreende cinco segmentos estreitos e o télson (ferrão) onde é vulgarmente chamado de cauda (Fig. 1). Seu orifício anal se localiza entre o 5º segmento do metassoma e o télson. Um par de glândulas de veneno se localiza na porção anterior do télson e um ferrão desenvolvido na extremidade posterior, algumas espécies de escorpião possuem em espinho acima do ferrão. Em sua face ventral está localizado o opérculo genital e um par de pectinas, também conhecido como pente, órgão sensorial complexo e ricamente innervado que está presente apenas em escorpiões (Cloudsley-Thompson, 1968).

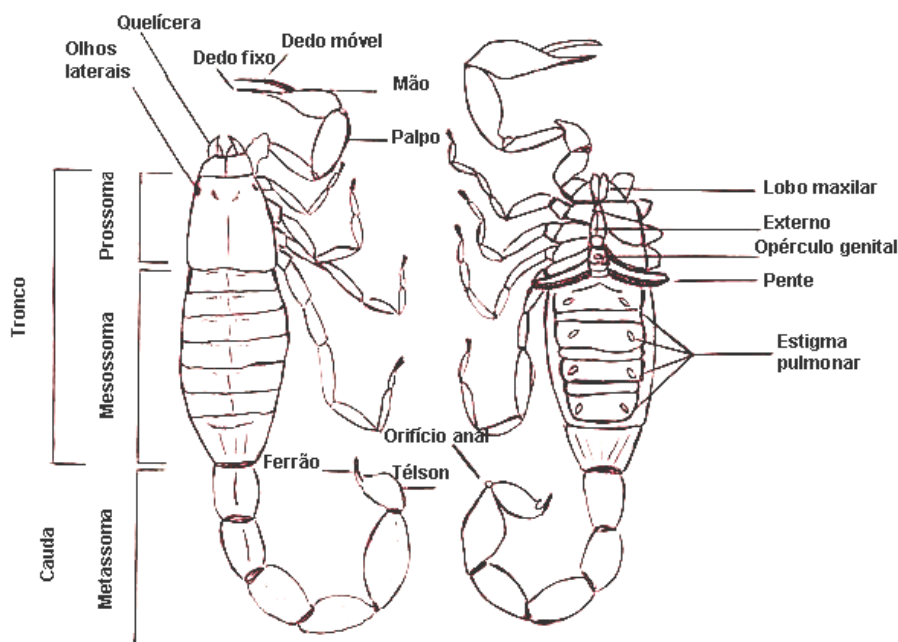


Figura 1: Representação esquemática da morfologia do escorpião.

Vista dorsal e ventral do escorpião. O prossoma compreende o cefalotox e apêndices e o opistossoma compreende o mesossoma e metassoma. Desenho de Guarnieri (1998) adaptado por Thais Melo Mendes.

Os escorpiões são dióicos com algumas pequenas diferenças entre machos e fêmeas. Geralmente os machos possuem os palpos mais robustos que as fêmeas e um pequeno espaço entre os dedos quando fechados. Algumas espécies possuem reprodução por partenogênese, não sendo observada a presença de machos, este fenômeno ocorre com *Tityus serrulatus* e *Liocheles australasiae* (Polis, 1990; Yamazaki *et. al.* 2001).

Os escorpiões dispõem de uma grande variedade de habitat, conseguindo ocupar ambientes como desertos, florestas tropicais, altitudes elevadas, cavernas e até áreas urbanas. Tem hábitos noturnos onde possuem maior atividade, incluindo a caça e durante o dia se recolhem em ambientes escuros como buracos, frestas, troncos de árvores, já em ambientes urbanos como entulho e sistemas de esgoto. Sua atividade é aumentada nos meses quentes do ano. São carnívoros e se alimentam de animais vivos. Nem sempre utilizam sua peçonha na captura do alimento, preferindo imobilizar a vítima apenas com seus palpos. Em períodos de escassez de alimento conseguem baixar seu metabolismo e ficar sem se alimentar por alguns meses, esta capacidade faz com que estes animais sejam bastante resistentes, favorecendo a colonização e ocupação dos mais diversos ambientes (Lourenço & Francke, 1985; Lourenço, 1988; Ministério da Saúde, 2009; Guarnieri, 1998).

3.2 *Tityus serrulatus*

Conhecido popularmente com escorpião amarelo (Fig. 2a), possui aproximadamente sete centímetros de comprimento, coloração amarela com o dorso marrom. Seu nome é derivado da presença de um par de serrilhas nos 3º e 4º segmentos de seu metassoma.

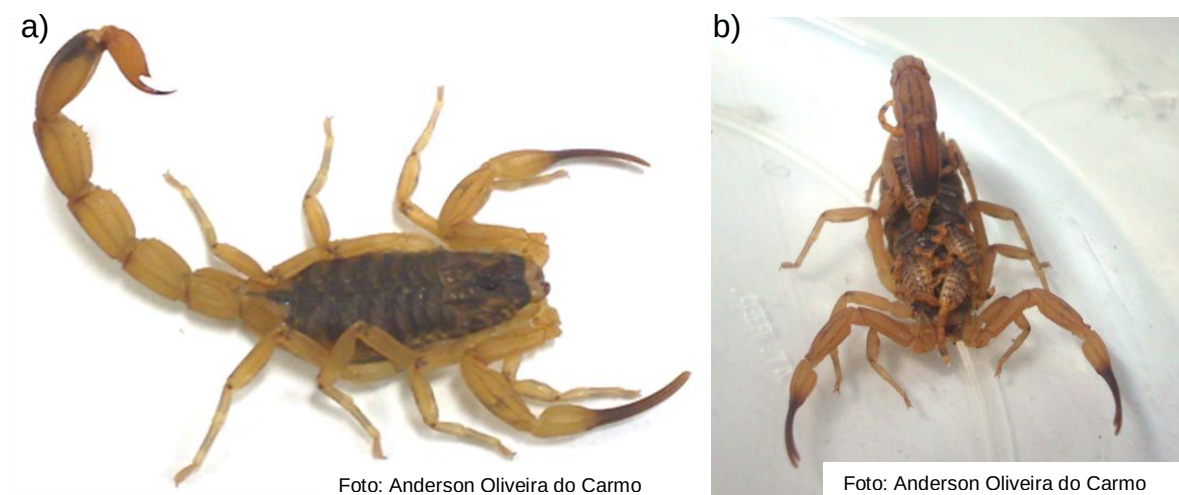


Figura 2: *Tityus serrulatus* em vista dorsal.

a) Nota-se no quarto segmento do metassoma (cauda) a presença de um par de serrilhas de onde deriva o nome *serrulatus*. b) *Tityus serrulatus* com a presença de filhotes no dorso, após o nascimento os filhotes migram para o dorso e permanecem junto à progenitora até a primeira ecdise.

Esta espécie possui ciclo de vida de aproximadamente quatro anos, são vivíparos e possuem reprodução assexuada por meio de partenogênese, apesar deste fato possuem constituição cariotípica conservada entre as populações sendo diplóides com $2n = 12$ formados por cromossomos holocêntricos, não apresentam recombinação na meiose, sendo portando apomeióticos (Schneider & Cella, 2010). Com base na filogenia molecular utilizando de marcadores moleculares SSR (sequências simples repetitivas) e de sequências do gene COXI (Citocromo C Oxidase, subunidade 1), presente no DNA mitocondrial, Scholte *et. al.* em 2009 não encontraram diferenças no padrão SSR de indivíduos provindos de populações diferentes, o sequenciamento do gene COXI apresentou alguns SNP's (polimorfismo de nucleotídeo único) mostrando uma pequena diferença entre as populações em estudo, devida ao fato desta espécie ter reprodução assexuada.

Existem apenas fêmeas desta espécie (Fig. 2b), que podem ter em média dois partos por ano com aproximadamente 20 filhotes em cada parto, chegando a ter até 160 filhotes em sua vida. Esses escorpiões são vivíparos e ao nascerem os filhotes migram para o dorso da mãe e permanecem alguns dias até realizarem sua primeira muda (Ministério da Saúde, Brasil, 2009).

A distribuição inicial deste escorpião compreende áreas de cerrado e caatinga (Fig. 3), porém, devido a sua rápida capacidade de reprodução e adaptabilidade em ambientes

urbanos *T. serrulatus* é encontrada em vários estados brasileiros como Minas Gerais, Bahia, Ceará, Pernambuco, Sergipe, Piauí, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Mato grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Tocantins, Distrito Federal, Paraná Santa Catarina e mais recentemente, alguns registros foram relatados para e casos isolados no Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde Brasil, 2009; Bortoluzzi *et. al.*, 2007; Torres *et. al.*, 2002; Borges *et. al.*, 2010).



Figura 3: Mapa de distribuição geográfica de *Tityus serrulatus*.

Ampla distribuição geográfica da espécie *T. serrulatus* pelo território brasileiro, evidenciando a grande capacidade de ocupação de ambientes diversos. Mapa modificado com base em Borges *et. al.* 2010.

São muito bem adaptados a ambientes urbanos que oferecem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, como grande disponibilidade de alimento principalmente baratas e também por possuírem inúmeros esconderijos como: entulhos, frestas de paredes, sistemas de esgoto, lápides de cemitérios, entre outros (Ministério da Saúde, 2009). Podem representar grande risco de extinção a outras espécies de escorpiões, pois sua adaptabilidade e capacidade de reprodução acelerada fazem de *T. serrulatus* um ótimo competidor ou mesmo um predador de outras espécies de escorpiões.

3.3 Veneno dos Escorpiões e Toxinas

O veneno produzido pelos escorpiões é provido de um par de glândulas localizadas no telson. O veneno é inoculado por meio do agulhão e atua nos tecidos internos, com características neurotóxicas.

O veneno recém extraído possui aspecto mucoso, coloração branca e solúvel em água, por centrifugação é possível a obtenção de uma fração solúvel e uma insolúvel (Guarnieri *et. al.*, 1998). Na fração insolúvel está presente o muco podendo haver toxinas enquanto a fração solúvel possui a maior parte das toxinas e proteínas do veneno, em sua maioria básica. Além de proteínas, o veneno possui várias outras substâncias como sais inorgânicos, aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos e aminas biogênicas, o veneno não possui, predominantemente, ações proteolíticas, fosfolipásica, fibrinolítica e colinesterásica detectáveis por ensaios farmacológicos (Zlotkin, 1978; Possani, 1984).

Outras substâncias podem estar presentes nos venenos escorpiônicos. Algumas espécies apresentam uma proteína com atividade hialuronidásica, que pode contribuir para a dispersão do veneno, podem conter ainda proteínas com atividade hipotensora e serotonina e histamina (Adam & Weiss, 1958; Diniz & Gonçalves, 1960; Ismail *et. al.*, 1975; Possani *et. al.*, 1977; Wright *et. al.*, 1977; Verano-Braga, *et. al.* 2008).

O modo de ação dos venenos escorpiônicos é alvo de vários estudos. Os primeiros trabalhos publicados demonstraram que os efeitos tóxicos provenientes do envenenamento eram devidos a ação do veneno no sistema nervoso central principalmente no bulbo (Magalhães, 1928; Barros, 1937 e 1938).

Após as primeiras purificações e com o isolamento de frações tóxicas do veneno bruto foi induzida a realização de várias pesquisas na demonstração dos verdadeiros alvos das toxinas (Gomez & Diniz, 1966). Os trabalhos subsequentes conseguiram demonstrar que o principal alvo dos venenos escorpiônicos está presente no sistema nervoso periférico. Porém, existem algumas evidências de que o veneno escorpiônico possui capacidade de atuar no sistema nervoso central causando um aumento na amplitude de condução de impulsos nervosos cerebrais, além de apresentar permeabilidade à barreira hematoencefálica de ratos jovens, podendo ser correlacionados em casos de envenenamento e crianças (Guidine *et. al.*, 2009)

As toxinas escorpiônicas são de natureza polipeptídica de baixo peso molecular e caráter básico. Elas podem ser divididas em quatro grupos principais levando em consideração seu alvo. Toxinas que agem em canais para Sódio (Rochat *et. al.*, 1979; Catterall, 1980), canais para Potássio (Carbone *et. al.*, 1982; Possani *et. al.*, 1982; Miller *et.*

al., 1985), canais para Cálcio (Valdivia & Possani, 1998) e canais para Cloro (Debin *et. al.*, 1993). As toxinas menores (com até 40 resíduos de aminoácidos) costumam afetar canais para potássio e cloro (Miller *et. al.*, 1985; Debin *et. al.*, 1993). Já as toxinas grandes (com 60 a 70 resíduos) atuam em canais para sódio (Zlotkin *et. al.*, 1978; Rochat *et. al.*, 1979). As toxinas que atuam em canais para cálcio possuem grande heterogeneidade em relação a seu tamanho (Valdivia *et. al.*, 1992; Chuang *et. al.*, 1998; Fajloun *et. al.*, 2000; Mosbah *et. al.*, 2000; Olamendi-Portugal *et. al.*, 2002).

A estrutura das toxinas escorpiônicas é muito parecida entre si, mesmo com grandes diferenças entre as suas sequências primárias. Elas possuem uma ou duas α -hélices e de 2-3 folhas- β e são estabilizadas por três ou quatro pontes dissulfeto que mantêm sua estrutura fortemente coesa (Fontecilla-Camps, 1989; Miller, *et. al.*, 1985).

Toxinas que atuam em canais para sódio são consideradas as principais toxinas escorpiônicas por serem mais abundantes, tóxicas e melhor caracterizadas. As primeiras toxinas purificadas pertencem a este grupo (Gómez & Diniz, 1966; Miranda *et. al.*, 1970). Estas toxinas são constituídas de pequenos polipeptídios com tamanho entre 58 a 76 resíduos, são fortemente estruturadas com três pontes dissulfeto, em alguns casos, pode haver uma quarta ponte dissulfeto com arranjos diferentes. Sua estrutura terciária é bastante similar mantendo o padrão de três segmentos formando uma folha- β e uma α -hélice na conformação $\beta\alpha\beta$ (Rodriguez De La Vega & Possani, 2005).

Dentre as toxinas que agem em canais para sódio, existe uma divisão entre toxinas α e β . Esta divisão está relacionada com seus efeitos farmacológicos e propriedades de ligação (Jover *et. al.*, 1980; Couraud *et. al.*, 1982; Gordon *et. al.*, 1998). As primeiras toxinas a serem purificadas pertencem à classe das toxinas α e se ligam ao sítio 3 de canais para sódio dependentes de voltagem, possuem a propriedade de retardar ou bloquear a inativação destes canais. Já as toxinas β , foram purificadas mais tardiamente e atuam no sítio 4 de canais para sódio dependentes de voltagem e agem na modulação da ativação destes canais.

Além da primeira divisão entre α ou β , estas podem ainda ser subdivididas de acordo com similaridades de sequências, alvo de ação e preferências por canais para sódio de insetos ou mamíferos. As toxinas α podem ser subdivididas ainda em três grupos distintos: as α clássicas, muito tóxicas a mamíferos, porém sem toxicidade a insetos; as α anti-inseto são tóxicas a insetos e pouco tóxicas a mamíferos e as toxinas tipo- α , que exibem alta toxicidade quando injetadas intra cérebro ventricular de camundongos e ratos, porém baixa atividade quando injetadas por via subcutânea. Já as toxinas β podem ser divididas em: β clássicas, que possuem alta atividade em mamíferos e são encontradas apenas em

escorpiões do gênero *Centruroides*; as toxinas tipo-Ts γ , altamente tóxicas a insetos e mamíferos e encontradas apenas no gênero *Tityus* anti-inseto e as β anti-crustáceo que apresentam alta toxicidade a insetos e crustáceos e ainda podem ter ação depressora ou excitatória (Gordon *et. al.*, 1998; Possani *et. al.*, 1999; Froy & Gurevitz, 2003; Gordon & Gurevitz, 2003; Rodriguez De La Vega & Possani, 2007).

Além destas toxinas, os venenos de escorpiões são ricos em toxinas que atuam em canais para potássio. Desde a descoberta da primeira toxina que atua neste tipo de canal aproximadamente outras 140 estruturas já foram identificadas (Possani *et. al.*, 1982; Rodriguez De La Vega & Possani, 2004).

Este grupo de toxinas possui tamanho molecular com ampla variação, sua cadeia peptídica pode conter entre 20 – 70 resíduos de aminoácidos, porém a maioria das toxinas tem tamanho aproximado de 40 resíduos. Sua conformação terciária é estabilizada por três ou quatro pontes dissulfeto.

O grupo de toxinas que atuam em canais para potássio possui nomenclatura já bem estabelecida, inicialmente proposta por Tytgat *et. al.*, 1999. Esta nomenclatura se baseia em similaridades de sequências, tamanho da toxina e localização dos resíduos de cisteínas. Este grupo pode ser dividido ainda em quatro famílias: α -KTx, β -KTx, γ -KTx e mais recentemente κ -KTx (Goudet *et. al.*, 2002; Nirthanan, *et. al.*, 2005).

As α -KTx são caracterizadas por cadeias curtas, o que engloba a maioria das toxinas que atuam neste tipo de canais e podem ainda ser sub-classificadas em 19 famílias. Além das famílias principais elas ainda podem ser subdivididas em várias categorias de acordo com suas sequências primárias de resíduos de aminoácidos (Tytgat *et. al.*, 1999; Wang *et. al.*, 2000; Batista *et. al.*, 2002; Rodriguez De La Vega & Possani, 2004; Xu *et. al.*, 2004; Olamendi-Portugal *et. al.*, 2005; Wang *et. al.*, 2005).

As β -KTx possuem cadeia polipeptídica maior com cerca de 60-65 resíduos e estabilizadas por três pontes dissulfeto. Esta família possui até o momento quatro membros, destes, apenas um foi caracterizado farmacologicamente, os outros foram isolados através de métodos de biologia molecular, sendo agrupados a este grupo por similaridades de sequências (Rogowski *et. al.*, 1994; Legros *et. al.*, 1996; Zhu *et. al.*, 1999).

As toxinas γ -Ktx, possuem tamanho aproximado de 42 resíduos e três pontes dissulfeto, este grupo é distinto das α -KTx pela sequência de resíduos e pelo padrão de suas pontes dissulfeto, distintos das demais toxinas. Esta família atua especificamente em canais para potássio “delayed rectifier” (Gurrola *et. al.*, 1999; Pardo-Lopez *et. al.*, 2002; Korolkova *et. al.*, 2001, 2002; Corona *et. al.*, 2002).

A família das κ -KTx é a mais recente dentre as toxinas que atuam em canais para potássio. Possuem cadeia curta e organização designada como uma “bi-hélice” (Srinivasan *et. al.*, 2002; Chagot *et. al.*, 2005; Nirthanan *et. al.*, 2005).

As toxinas que atuam em canais para cloro possuem cadeias curtas com cerca de 35 - 38 resíduos de aminoácidos, estão fortemente estabilizadas por quatro pontes dissulfeto. Estas toxinas possuem alta similaridade entre si, principalmente nas posições das cisteínas e atuam no bloqueio de canais para cloro (Tytgat *et. al.*, 1998; Zeng *et. al.*, 2000a; Zhijian *et. al.*, 2006).

A família de toxinas que atuam em canais para cálcio é bastante heterogênea em relação às sequências de resíduos, apesar disso, não possuem muitos membros nesta categoria. Fazem parte dela peptídeos com tamanhos muito variados, assim como suas sequências primárias e padrões de posição das cisteínas. Toxinas que atuam em canais para cálcio exibem especificidade ao tipo de canal, além de atuar principalmente como bloqueadores destes. Nesta família estão presentes toxinas específicas a canais para cálcio, como também algumas toxinas que apresentam ação dupla, com alvos nestes canais e em canais para sódio com manifestações próximas as α -toxinas de canais para sódio (Valdivia & Possani, 1998; Chuang *et. al.*, 1998; Fajloun *et. al.*, 2000; Wu *et. al.*, 2001; Norton & McDonough, 2008).

Existe ainda um grupo de peptídeos sem pontes dissulfeto que possuem atividades biológicas. Este grupo possui tamanho variando de 13 – 50 resíduos com baixas similaridades. Suas ações são bastante diversificadas podendo atuar como antimicrobianos, iniciação da sinalização celular, modulação imune, potencialização de bradicinina entre outras ações (Torres-Larios *et. al.*, 2000; Dai *et. al.*, 2001, 2002; Zeng *et. al.*, 2000b, 2001, 2004, 2005; Luo *et. al.*, 2005; Diego-Garcia *et. al.*, 2005; Verano-Braga *et. al.*, 2008).

O veneno de escorpiões também possui algumas enzimas como proteases e hialuronidases. Diferente de outros venenos de outros animais como de serpentes, aranhas, insetos e outros animais, a função das enzimas presentes no veneno escorpiônico esta relacionada principalmente com a difusão do veneno pelos tecidos (Almeida *et. al.*, 2002; Cologna *et. al.*, 2009). As hialuronidases são um grupo de enzimas capazes de quebrar a molécula de ácido hialurônico (um polissacarídeo de alto peso molecular) presente na matriz extracelular, encontrada principalmente em conexões de tecidos (Kreil, 1995; Pessini, *et. al.*, 2001). Já as demais proteases escorpiônicas, além de agir na difusão do veneno, também podem estar envolvidas com o processamento pós-traducional de diversas toxinas para que se tornem ativas nestes venenos (Tan & Ponnudurai, 1992; Fletcher *et. al.*, 2010).

3.4 Veneno de *T. serrulatus* e sua nomenclatura

Tityus serrulatus é o escorpião do gênero *Tityus* que possui o maior número de estudos sobre seu veneno, este fato se deve a maior toxicidade de seu veneno e aos frequentes casos de acidentes envolvendo este escorpião. Apesar da quantidade de trabalhos publicados sobre esta espécie ainda existem vários aspectos sobre sua biologia e veneno que merecem destaque na pesquisa.

Os primeiros estudos envolvendo o veneno desta espécie datam da década de 60. Gomez & Diniz em 1966, através de gel filtração obtiveram quatro picos, sendo que destes dois eram tóxicos. O segundo pico tóxico (T_2) foi então cromatografado em coluna CM-52 e apresentou apenas um pico, este por sua vez foi chamado de “*Tityustoxina*”. A partir desta primeira purificação surgiram diversas publicações descrevendo novas toxinas deste veneno. A seguir a descrição das toxinas conhecidas até o momento.

A toxina Ts1 pertence à classe das β -toxinas e inicialmente foi chamada por diversos outros nomes como $Ts\gamma$, representando uma nova classe de β -toxinas (Toledo & Neves, 1976; Barhaning *et. al.*, 1982, 1983, 1984; Jonas *et. al.* 1986). Esta toxina desperta muito interesse em pesquisadores por ser altamente tóxica em mamíferos e insetos. Além disso, essa toxina pode representar aproximadamente 15% da fração solúvel de veneno (Pessini *et. al.*, 2001).

Outra β -toxina presente neste veneno é a Ts2 que possui 62 resíduos de aminoácidos e compartilha 72% de identidade com a Ts1 (Mansuelle, *et. al.*, 1992). Ts2 compartilha além dos efeitos farmacológicos clássicos das β -toxinas algumas propriedades de α -toxinas, como o prolongamento dos potenciais de ação. Sendo assim ainda é necessário mais trabalhos para a determinação exata de seus efeitos (Sampaio *et. al.*, 1991, Alvarenga *et. al.*, 2005).

A toxina Ts3 é a principal α -Toxina do veneno de *T. serrulatus*, possui caráter básico e 64 resíduos de aminoácidos. Atua no sítio 3 em canais para sódio dependentes de voltagem e impede ou lentifica a inativação deste tipo de canal iônico (Martin-Euclaire, *et. al.*, 1994). a Ts3 será descrita com maiores detalhes a seguir.

A proteína Ts4 ou TsNTxP é considerada não tóxica pois não provoca nenhum efeito de intoxicação causado por outras toxinas escorpiônicas, ela é constituída de 62 resíduos, a Ts4 difere da TsNTxP em apenas um resíduo na posição 50 com a substituição de um ácido aspártico por um ácido glutâmico. Possui ainda alta similaridade a sequências primárias de resíduos de aminoácidos de outras toxinas deste escorpião. Esta proteína possui ainda a capacidade de induzir reação alérgica (Chávez-Olórtegui *et. al.* 1996; Marangoni *et. al.*,

1990; Sampaio *et. al.*1996). Anticorpos policlonais produzidos contra a TsNTxP tem a capacidade de neutralizar o veneno total de *T. serrulatus*, por reação cruzada com outras toxinas, apresentando boa alternativa na produção de soro (Chávez-Olórtegui *et. al.*, 1997; Mendes *et. al.* 2004).

A Ts5, outra α -toxina que atua em canais para sódio é um dos componentes mais tóxicos deste veneno que pode conter aproximadamente 2% desta toxina (Arantes *et. al.*, 1994). Ela pode ainda interferir indiretamente em canais para potássio, aumentando sua permeabilidade a este íon. Ts5 também é capaz de liberar óxido nítrico (Marangoni *et. al.*, 1995; Bomfim *et. al.*, 2005; Vasconcelos *et. al.*2005).

As toxinas Ts6, Ts7, Ts8 e Ts9 fazem parte das toxinas de *T. serrulatus* que atuam em canais para potássio. A Ts6 é uma α -KTx constituída por 41 resíduos e quatro pontes dissulfeto. Ela é capaz de bloquear canais para potássio e sua ligação a estes canais pode ainda ser revertida (Arantes *et. al.*, 1989; Tytgat *et. al.*, 1999; Pimenta *et. al.*, 2003a; Coronas *et. al.*, 2003). Já a Ts7, também pertencente à classe das α -KTx é capaz de bloquear canais de potássio com alta afinidade, sendo mais específica ao subtipo Kv 1.3 (Werkman *et. al.*, 1993; Eccles *et. al.*,1994; Rodrigues *et. al.*, 2003). A Ts8 pertence à família das β -KTx, sua sequência é derivada de cDNA e é capaz de bloquear seletivamente canais de potássio dependentes de voltagem (Rogowski *et. al.*, 1994; Kalapothakis *et. al.*, 2001). A toxina Ts9 faz parte da classe das κ -KTx, possui 35 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, se liga com muita afinidade a canais de potássio sensíveis a cálcio e é capaz de ativar canais de potássio dependentes de voltagem (Legros *et. al.*, 1996; Blanc *et. al.*,1997).

O veneno deste escorpião possui também alguns peptídeos com ação biológica. Ts10 é um de potencializador de Bradicinina (Ferreira *et. al.*, 1993). Ts11, Ts12, Ts13, são pequenos peptídeos com cerca de 29 resíduos e fortemente estruturados em 4 pontes dissulfeto, ainda não possuem ação biológica determinada, porém possuem alta similaridade a porção c-terminal de algumas toxinas ativas em canais para potássio (Pimenta *et. al.*, 2003). O grupo de peptídeos descobertos mais recentemente é chamado de hipotensinas, estes peptídeos possuem similaridade com outros peptídeos potencializadores de bradicinina. São capazes de potencializar os efeitos de bradicinina e induzir vasodilatação em endotélio-dependente com liberação de óxido nítrico (Verano-Braga, *et. al.*, 2008, 2010).

O veneno de *T. serrulatus* possui uma hialuronidase que não é responsável diretamente pelas atividades tóxicas do envenenamento, porém é importante no processo de difusão das toxinas pelos tecidos acometidos, foi verificado inclusive que a atividade da Ts1 é maior na presença desta enzima (Pessini *et. al.*, 2001). Outras enzimas como

proteases são encontradas neste veneno. Recentemente foi verificada a presença de metaloproteases (VAMP's). Estas enzimas clivam especificamente proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment receptor*), que estão presentes no pâncreas e relacionadas à formação e adesão de vesículas de transporte e secretórias. As presenças das proteases VAMP's podem estar associadas à pancreatite desenvolvida em alguns pacientes após envenenamento (Fletcher *et. al.*, 2010).

A nomenclatura das toxinas escorpiônicas, em especial de *T. serrulatus* vem passando por diversas mudanças ao longo das pesquisas. Vários pesquisadores isolaram a mesma toxina e a chamaram de nomes diferentes causando grande confusão na nomenclatura, na época das primeiras purificações o sequenciamento de proteínas era uma técnica de difícil acesso fazendo com que a mesma toxina isolada por grupos diversos recebesse também nomes diferentes por serem obtidas de metodologias variadas. Além disso, as toxinas purificadas muitas vezes eram caracterizadas em metodologias diversas, gerando mais variação nos resultados e conseqüentemente em sua nomenclatura.

Devido às divergências de nomenclatura de toxinas, será utilizada neste trabalho a proposta realizada por Becerril *et. al.*, (1996). Proposta de nomenclatura que se baseia nas iniciais do nome científico do escorpião, como Ts (*Tityus serrulatus*), seguido de um numeral (Tabela 1). Esta nomenclatura está sendo adotada por diversos autores para a designação das toxinas de *T. serrulatus* (Possani *et. al.*, 1999; Teixeira *et. al.*, 2003; Campos *et. al.* 2004, 2006 e 2008; Mendes *et. al.*, 2008; Cologna *et. al.* 2009).

Tabela 1: Nomenclatura das toxinas de *Tityus serrulatus*.*

Nome	Outros nomes	Canal de Ação	Referencias
Ts1	TsTX-I; toxin β , γ -Toxin, Toxin T2- IV; Toxin Ts7; Ts VII; Toxin VII; TsTX-VII; <i>Tityustoxin</i> VII; Toxin III-10; Toxin II-11	Sódio	Pinheiro <i>et. al.</i> , 2003 Polikarpov <i>et. al.</i> , 1999 Becerril <i>et. al.</i> , 1993 Martin-Eauclaire <i>et. al.</i> , 1992
Ts2	TsTX-III; III-8; Tst2; Toxin II; TsTX-II; <i>Tityustoxin</i> II; Toxin T1-IV; beta toxin TsII	Sódio	Possani <i>et. al.</i> , 1991 Mansuelle <i>et. al.</i> , 1992
Ts3	TsTX; <i>Tityustoxin</i> ; Toxin IV-5 TsIV-5; Ts IV alphatoxin; Ts IV; Toxin-4; <i>Tityustoxin</i> IV; Toxin IV; Ts III; Toxin-3;	Sódio	Possani <i>et. al.</i> , 1991 Martin-Eauclaire <i>et. al.</i> , 1994 Corona <i>et. al.</i> 1996
Ts4	TsTX-VI; <i>Tityustoxin</i> -6; <i>Tityustoxin</i> VI; TsTXVI; Toxin VI; Ts VI; Non-toxic protein NTxP; TsNTxP; TsnTxp; NTxp	Não-toxica Imunogênica	Marangoni <i>et. al.</i> , 1990 Sampaio <i>et. al.</i> , 1996 Chávez-Olórtegui <i>et. al.</i> 1997
Ts5	TsTX-V; <i>Tityustoxin</i> -5; <i>Tityustoxin</i> V; alpha toxin TsTX-V; Ts V; Toxin V	Sódio	Marangoni <i>et. al.</i> 1995
Ts6	TsTX-IV; α -KTx12.1; Potassium channel toxin alpha- KTx12.1; Butantoxin; BuTX	Potássio	Novello <i>et. al.</i> 1999 Pimenta <i>et. al.</i> , 2003a Oyama <i>et. al.</i> 2005 Holaday <i>et. al.</i> , 2000
Ts7	TstX-K α ; <i>Tityustoxin</i> Kalpha; Potassium channel toxin alpha-KTx 4.1; TsII- 9; TsTx-K-alpha; TSK4; Toxin II-9	Potássio	Blaustein <i>et. al.</i> , 1991 Ellis <i>et. al.</i> , 2001 Rogowski <i>et. al.</i> , 1994 Possani <i>et. al.</i> , 1982
Ts8	<i>Tityustoxin</i> K-beta; TSK2 TsTX-K beta; TsTx-K β ;	Potássio	Legros <i>et. al.</i> , 1998 Kalapothakis <i>et. al.</i> , 2001
Ts9	<i>Tityustoxin</i> K-beta; TSK2 TsTX-K beta; TsTx-K β ;	Potássio	Legros <i>et. al.</i> , 1996 Blanc <i>et. al.</i> , 1997
Ts10	Peptide T		Ferreira <i>et. al.</i> , 1993 Pimenta <i>et. al.</i> , 2003a
Ts11	TsPep1; Peptide TsPep1		Pimenta <i>et. al.</i> , 2003b
Ts12	TsPep2; Peptide TsPep2		Pimenta <i>et. al.</i> , 2003b
Ts13	TsPep3; Peptide TsPep3		Pimenta <i>et. al.</i> , 2003b
Ts14	Hypotensin-1 (TsHpt-I) Hypotensin-2 (TsHpt-II) Hypotensin-3 (TsHpt-III) Hypotensin-4 (TsHpt-IV)	Hipotensor	Verano-Braga <i>et. al.</i> , 2008

* Tabela retirada de Cologna *et. al.*, 2009. Modificada por Anderson Oliveira do Carmo.

Atualmente existe um esforço para a uniformização dos nomes de toxinas pela *International Society on Toxinology* que esta reunindo vários pesquisadores na área como o professor doutor Evanguedes Kalapothakis, entre outros, para que haja regras bem definidas para a uniformização nos nomes das toxinas já conhecidas bem como para novas toxinas descobertas.

3.5 A Toxina Ts3

Ts3 foi a primeira toxina purificada a partir do veneno bruto de *T. serrulatus* (Coutinho-Neto, 1975). Após a sua purificação foram verificados que seus efeitos resultavam na liberação de neurotransmissores, despolarização de membranas, influxo de Na⁺ e

ativação de canais para sódio dependentes de voltagem. (Warnick *et. al.*, 1976; Drumond *et. al.*, 1995; Gomez *et. al.*, 1995a). Esta toxina foi inicialmente chamada de TsTx, e caracterizada como uma proteína básica de 61 aminoácidos. Através de estudos de correntes de sódio em células com canal único utilizando a Ts3 foi determinado que esta toxina fizesse parte da classe de α -toxinas (Kirsch *et. al.*, 1989).

Mais tarde Martin-Eauclaire *et. al.*, em 1994, realizou a primeira caracterização genômica desta toxina. Sua sequência nucleotídica com base em cDNA apresentou, após tradução, uma ORF que codifica 80 resíduos, sendo que destes 13 fazem parte de seu peptídeo sinal. Além disso, os últimos três aminoácidos são processados após a tradução. Desta maneira esta toxina madura apresenta 62 resíduos de aminoácidos fortemente estabilizados por quatro pontes dissulfeto. Em 1995, Corona *et. al.*, demonstrou que o gene que codifica esta toxina possui dois *exons* (1-28 e 376-659) e um *intron* (29-375). O primeiro *exon* compreende os nove primeiros aminoácidos do peptídeo sinal, enquanto o segundo possui o restante do peptídeo sinal e a sequência da Ts3 madura. Porém, os primeiros aminoácidos do peptídeo sinal não foram determinados, provavelmente devido a falhas na síntese do cDNA, não sendo encontrada a metionina inicial. Sua estrutura terciária ainda não foi determinada, mas devido a similaridades de sequências e ferramentas de Bioinformática a estrutura teórica da Ts3 (Fig. 4) pode ser visualizada, demonstrando alta similaridade com outras toxinas escorpiônicas.

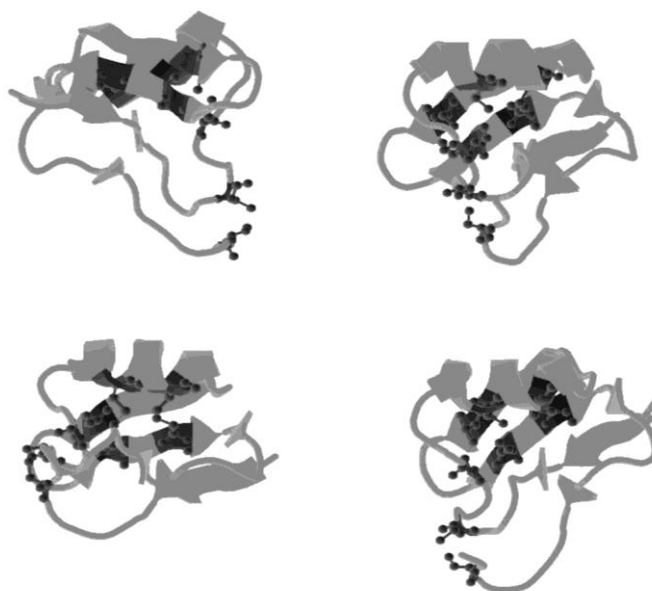


Figura 4: Conformação tridimensional da Ts3.

Representação da conformação tridimensional da Ts3 de 4 ângulos diferentes obtida pelo programa on-line "ModWeb Server". Figura obtida com auxílio do programa RASMOL. Em destaque as oito cisteínas responsáveis pelas quatro pontes dissulfeto. Note a presença de uma α -hélice e 3 segmentos alinhados em folhas- β .

Esta toxina provoca a liberação de neurotransmissores como catecolaminas e acetilcolina (Lima & Freire-Maia, 1977; Gomez *et. al.*, 1995b; Clemente *et. al.*, 2002), provoca ainda relaxamento de corpos cavernosos pela liberação de óxido nítrico (Teixeira *et. al.*, 2004). Ts3 também afeta a liberação de GABA, glutamato e aspartato tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Massensini *et. al.*, 1998).

A Ts3 se liga especificamente ao sítio 3 de canais para sódio dependentes de voltagem (Campos *et. al.*, 2004). A ligação desta toxina ao seu alvo provoca o bloqueio da inativação ou torna lento o fechamento destes canais, dessa maneira os canais para sódio permanecem por mais tempo abertos, diminuindo a condutância. Para que sua ação seja verificada é necessária à presença de sódio extracelular, contudo sua ligação ao sítio alvo não depende da presença deste íon (Cruz, *et. al.*, 2000; Campos & Beirão, 2006).

3.6 Escorpionismo e epidemiologia no Brasil

O termo escorpionismo é designado para se referir aos acidentes que envolvem picadas de escorpião.

Devido à ampla distribuição de diversas espécies de escorpiões no Brasil, atualmente calcula-se mais de 30.000 registros de acidentes anualmente, estes números vêm crescendo a cada ano devido à implantação de notificação dos acidentes, antes desta medida muitos casos eram sub-notificados (Ministério da saúde, 2009).

Dentre os casos registrados cerca de 50% são oriundos da região sudeste (Tabela 2). Sendo que as espécies *T. serrulatus* e *T. bahiensis* são os maiores responsáveis por estes casos. A espécie que mais causa acidentes fatais é *T. serrulatus*, sendo responsável pela quase totalidade dos casos que evoluem a óbitos (Soares, *et. al.*, 2002).

A maior parte dos acidentes envolvendo escorpiões na região sudeste se dá nos meses de alta temperatura e pluviosidade, já na região nordeste e norte não há mudanças climáticas de grande magnitude durante o ano, o que não interfere em aumento dos acidentes em determinada época do ano. Outro fator interessante é que a maioria dos acidentados pertence ao sexo masculino, e os casos aumentam em relação à idade atingindo um pico entre a faixa etária de 20-29 anos (Ministério da saúde, 2009).

Tabela 2: Escorpionismo no Brasil, acidentes e óbitos*.

Ano	2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008	
	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos	Total	Óbitos
Região Norte	418	1	680	1	947	3	1.380	2	1.603	1	1.917	3	2.047	5	2.013	5	2.110	5
Rondônia	31	0	54	1	63	0	133	0	167	1	191	0	143	1	79	0	67	0
Acre	8	0	6	0	16	0	21	0	30	0	28	0	48	0	65	0	81	0
Amazonas	9	0	20	0	41	0	85	0	119	0	166	2	188	0	126	0	185	1
Roraima	1	0	16	0	21	0	12	0	18	0	13	0	24	0	33	0	35	0
Pará	309	1	504	0	631	3	885	2	998	0	1.159	1	1.267	3	1.330	5	1.331	3
Amapá	11	0	12	0	57	0	78	0	102	0	117	0	149	0	150	0	138	0
Tocantins	49	0	68	0	118	0	166	0	169	0	243	0	228	1	230	0	273	1
Região Nordeste	7.802	13	8.515	21	10.402	25	10.478	15	13.132	16	16.143	12	19.063	13	19.415	30	18.161	42
Maranhão	19	0	34	0	63	0	86	0	90	1	132	0	159	0	142	0	138	0
Piauí	129	0	197	0	180	0	261	0	207	0	309	1	320	1	269	1	338	1
Ceará	8	0	270	0	363	1	341	0	620	1	867	0	563	0	633	0	462	2
Rio Grande do Norte	1.318	0	1.251	0	1.267	0	1.131	0	1.245	0	1.427	1	1.552	0	1.280	1	1.192	2
Paraíba	181	0	80	0	345	0	301	0	395	0	640	0	899	0	1.038	3	1.156	2
Pernambuco	545	1	860	0	1.230	0	2.185	2	3.744	1	4.361	2	6.837	1	7.087	5	5.249	9
Alagoas	2.527	0	2.082	0	2.378	3	2.102	0	2.322	1	2.249	0	2.601	0	2.874	0	3.259	1
Sergipe	6	0	15	0	28	0	16	0	40	0	48	0	129	0	256	1	267	1
Bahia	3.069	12	3.726	21	4.548	21	4.055	13	4.469	12	6.110	8	6.003	11	5.836	19	6.100	24
Região Sudeste	3.791	1	7.887	19	10.093	23	11.276	31	13.546	22	15.836	29	14.418	9	13.884	24	16.138	35
Minas Gerais	1.189	1	4.775	18	6.331	20	7.023	25	8.537	17	10.121	20	8.849	8	8.468	16	9.660	22
Espírito Santo	203	0	206	0	289	1	354	2	747	1	994	3	757	0	768	5	1.112	3
Rio de Janeiro	81	0	110	0	129	1	216	0	198	2	242	3	235	0	243	1	215	2
São Paulo	2.318	0	2.796	1	3.344	1	3.683	4	4.064	2	4.479	3	4.577	1	4.405	2	5.151	8
Região Sul	81	0	373	0	431	0	479	0	540	0	677	0	768	0	985	0	996	0
Paraná	10	0	278	0	269	0	346	0	381	0	516	0	560	0	728	0	739	0
Santa Catarina	59	0	83	0	124	0	104	0	107	0	109	0	149	0	189	0	194	0
Rio Grande do Sul	12	0	12	0	38	0	29	0	52	0	52	0	59	0	68	0	63	0
Região Centro-Oeste	612	1	733	2	891	6	873	3	1.245	3	1.366	4	1.355	1	1.134	2	1.451	4
Mato Grosso do Sul	6	0	25	0	44	0	35	0	79	0	138	0	160	0	115	0	270	0
Mato Grosso	15	0	86	0	126	1	128	0	265	1	277	1	307	1	369	0	424	2
Goias	372	1	429	2	606	5	550	3	740	2	818	3	768	0	525	2	591	2
Distrito Federal	219	0	193	0	115	0	160	0	161	0	133	0	120	0	125	0	166	0
Brasil	12.704	16	18188	43	22.764	57	24.486	51	30066	42	35939	48	37651	28	37.431	61	38.856	86

* Disponível no site do ministério da saúde: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/escorpioes2.pdf> e http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_ac_escorpioes_bra_00a09_tabela.pdf. Em destaque o numero de casos registrados em Minas Gerais e no Brasil. Modificado por Anderson Oliveira do Carmo

3.6.1 Quadro clínico e tratamento

Os acidentados por escorpiões exibem amplo espectro de sintomas e complicações inerentes à ação tóxica do veneno no organismo. Os sintomas associados à picada se devem a ação do veneno no sistema nervoso periférico com a liberação de neurotransmissores como acetilcolina, adrenalina e noradrenalina (Rang *et. al.* 1997).

A gravidade dos acidentes pode ser dividida em leve, moderada ou grave dependendo dos sintomas locais ou sistêmicos.

O principal sintoma associado à picada de escorpiões, sempre presente, é a manifestação de dor. A intensidade da dor dependerá da quantidade de veneno inoculada e da sensibilidade individual. A dor gerada pelo acidente escorpiônico pode se limitar ao local da picada, sendo caracterizada por forte ardor como queimação, porém, em casos mais graves a dor pode se espalhar e se manifestar mais intensamente na raiz do membro acometido, podendo ser mais intensa do que no próprio local da picada (Hering *et. al.*, 1992; Cupo *et. al.*, 1994). Mesmo com o cessar da dor, pode haver no local da picada dor associada à compressão do local podendo durar por alguns dias.

O local da picada nem sempre é visível, em alguns casos pode ocorrer hiperemia e edema leve no local da picada, quando presentes, se apresentam de maneira bem discreta. Também pode suceder sudorese e alterações térmicas no local da picada (Hering *et. al.*, 1992).

Casos que apresentam manifestações sistêmicas são caracterizados por bastante agitação, tremores generalizados e em ocasiões mais graves, principalmente em crianças o quadro de agravamento pode levar ao coma. Outro sintoma significativo é a sudorese que pode se manifestar mais agravada dependendo do caso. Nos casos mais intensos é observada a produção de suor frio, podendo levar a sensação de frio e mais extremamente a hipotermia. Salivação e lacrimação e corrimento nasal geralmente são um dos primeiros sintomas a aparecerem junto à dor acontecendo assim, em casos mais graves (Hering *et. al.*, 1992).

Alguns sintomas bastante graves como hipertensão ou hipotensão podem estar presentes juntamente com alterações de arritmia cardíaca. Além de edema pulmonar (Hering *et. al.*, 1992; Ministério da saúde, 2001).

O tratamento dos casos de escorpionismo se concentra primeiramente no combate aos sintomas provocados pela picada, sendo que a maioria dos casos se apresenta como leve. Cerca de 10% dos casos são considerados moderados e graves, estes casos ocorrem

principalmente em crianças, onde há o uso de soroterapia com objetivo de neutralizar o veneno circulante (Tabela 3). É utilizado o soro antiescorpiônico ou antiaracnídico que deve ser preferencialmente utilizado precocemente para neutralizar o veneno circulante e se evitar complicações futuras.

Tabela 3: Quadro clínico e tratamento dos acidentes escorpiônicos*

Classificação	Manifestações Clínicas	Tratamento	
		Específico	Geral
Leves	Somente presentes sinais e sintomas locais e dor local.	-	Combate à dor. Observação em ambiente hospitalar por 6-12 horas.
Moderados	Sintomatologia local e alguns sintomas sistêmicos tais como: agitação, sonolência, sudorese, náuseas, poucos vômitos, hipertensão arterial, taquicardia e taquipnéia.	2 - 3 ampolas de 5 mL principalmente para crianças até 7 anos de idade.	Combate à dor. Tratamento sintomático. Observação durante 12-24 horas
Graves	Sinais e sintomas locais e sistêmicos. Vômitos profusos e frequentes. Náuseas, sialorréia, lacrimejamento, sudorese profusa, agitação, alteração de temperatura, taquicardia, hipertensão arterial, taquipnéia, tremores, espasmos musculares, paralisias até convulsão. Pode evoluir para bradicardia, bradpnéia, edema pulmonar agudo, colapso cardiocirculatório, coma e morte.	4 – 6 ampolas para todos pacientes.	Combate à dor. Internação hospitalar com cuidados intensivos. Tratamento sintomático. Monitoramento e manutenção das funções vitais.

* Ministério da saúde, 2001

4. Justificativa

O soro antiescorpiônico produzido atualmente possui boa eficácia, todavia sua ação satisfatória depende da qualidade do soro, que deve neutralizar 5 DL₅₀ por mL de soro, além da rapidez do atendimento médico ao paciente (Maria, *et. al.*, 2005). Apesar deste fato, a produção de soro terapêutico possui vários problemas relacionados, tais como: dificuldade de se obter o veneno utilizado para a imunização dos cavalos; o alto custo de produção, principalmente na manutenção dos cavalos imunizados; o baixo tempo de sobrevivência desses animais devido à ação tóxica do veneno escorpiônico; a constante renovação dos cavalos utilizados na produção do soro, uma vez que vários animais não correspondem de maneira eficiente ao processo de imunização, produzindo soro com baixo poder neutralizante, sendo assim se faz necessário sua substituição; a utilização do veneno bruto que possui vários componentes não tóxicos e geram anticorpos inespecíficos às toxinas, diminuindo a qualidade do soro; a utilização de grande quantidade de soro para a neutralização do veneno em casos de acidentes mais graves.

O advento da tecnologia de toxinas recombinantes na produção de soros é uma alternativa muito atrativa para que possa acontecer uma melhora dos problemas apresentados. Bactérias usadas em expressão heteróloga podem chegar a produzir mais de 20% de sua massa proteica constituída de proteínas recombinantes. Além de alta produção, a expressão heteróloga é mais econômica e muitas vezes a proteína produzida não apresenta atividade, favorecendo sua utilização na produção de soros terapêuticos.

Nosso grupo vem caracterizando a produção de anticorpos e o poder de proteção a partir da imunização de toxinas recombinantes. Já foram obtidos muitos resultados satisfatórios que estimulam mais pesquisas para o aperfeiçoamento destas técnicas aplicadas a toxinas. Guatimosin *et. al.*, 2000 conseguiu produzir um soro anti-TsNTxP recombinante que confere proteção contra o veneno bruto, em 2008 Mendes *et. al.*, demonstrou que a toxina Ts1 recombinante consegue proteger parcialmente contra o veneno bruto, mas é capaz de neutralizar 14 DL₅₀ da Ts1 nativa. Além de toxinas de *T. serrulatus*, Kalapothakis *et. al.*, 2002 utilizou a toxina LiD1 recombinante do veneno de *Loxosceles intermédia*, obtendo resultados satisfatórios. Outros grupos de pesquisa, também utilizaram esta metodologia para a produção de anticorpos contra toxinas escorpiônicas obtendo sucesso (Bouhaouala-Zahar, 1996; Legros *et. al.*, 2002; Garcia *et. al.*, 2003)

Mesmo com os avanços de pesquisas em formas alternativas de produção de soro antiescorpiônico, as informações obtidas até o momento não são suficientes para a geração

de uma tecnologia que elimine a necessidade de imunização dos animais através do veneno bruto. Ainda é necessária a investigação de outros componentes tóxicos do veneno que possuam potencial para a produção de soro, além de utilizar mais de um componente recombinante do veneno na imunização dos animais, que pode gerar resposta imunológica mais eficaz contra os componentes tóxicos do veneno. Estes passos são necessários para que consigamos, a partir de toxinas recombinantes, obter um soro antiescorpiônico com poder de neutralização do veneno bruto igual ou superior a 5 DL₅₀ por 1 mL de soro, capacidade exigida para um soro de boa qualidade. Mais pesquisas nesta área são necessárias para o aperfeiçoamento das técnicas existentes e a obtenção de antígenos recombinantes que possam ser utilizados para a produção de soros terapêuticos, como para uma possível vacina contra o envenenamento causado por *Tityus serrulatus*.

5. Objetivos

5.1 Objetivos Gerais

Expressar a *Ts3* em sistema bacteriano e avaliar a capacidade desta toxina heteróloga na produção de um soro antiescorpiônico.

5.2 Objetivos Específicos

- Clonar a *ORF* da *Ts3* obtida da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *T. serrulatus*
- Expressar a *Ts3* em *E. coli*
- Purificar a *Ts3* recombinante
- Imunizar coelhos com a *Ts3* recombinante
- Caracterizar a *Ts3* recombinante por ELISA e SPOT
- Avaliar o reconhecimento e a proteção do soro anti-*Ts3* recombinante frente ao veneno bruto

6. Material e Métodos

6.1 Animais Utilizados e Genótipo das Linhagens de *E. coli*

- Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) Nova Zelândia Machos entre 3 e 4 quilos.
- Camundongos (*Mus musculus*) Swiss fêmeas com peso entre 18 e 22 g.
- Linhagens de *Escherichia coli*
 - XL1Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)] (Stratagene).
 - Origami 2 (DE3): $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ F'[*lac⁺ lacI^q pro*] (DE3) *gor522::Tn10 trxB* (Str^R, Tet^R)
 - As linhagens C41 e C43 são derivadas da linhagem BL21 (DE3).
 - C41 (DE3): F⁻*ompT*, gal hsdSB (rB⁻mB⁻) dcm lon λDE3 e uma mutação não caracterizada (Miroux & Walker,1996).
 - C43 (DE3): F⁻*ompT*, gal hsdSB (rB⁻mB⁻) dcm lon λDE3 e duas mutações não caracterizadas (Miroux & Walker,1996).

6.2 Obtenção do clone de cDNA correspondente à ORF da Ts3

Nosso laboratório possui uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Através do sequenciamento dos clones desta biblioteca foi encontrado o cDNA correspondente a Ts3 madura.

A busca pelo cDNA da Ts3 assim como a biblioteca foram previamente realizados em nosso laboratório.

6.3 Seleção dos Vetores Bacterianos

Para este trabalho foram selecionados três vetores distintos. Um vetor para a clonagem do produto de PCR portando adaptadores e dois vetores de expressão.

O vetor de clonagem pCR2.1 TOPO (Fig. 5) foi selecionado para este trabalho por ser designado a clonagem de produtos de PCR. A enzima Taq DNA adiciona uma adenina ao final de cada produto de PCR resultante da reação de PCR, o que gera uma extremidade coesiva. Conhecendo esta característica, o vetor linear possui em suas extremidades 3' uma timina coesiva, que auxilia na ancoragem do produto de PCR e evita que o vetor se ligue

sem a presença de um inserto. A ligação entre o produto de PCR e o vetor é mediada pela enzima Topoisomerase, levando alta proporção de ligação. Além disso, este vetor possui dois marcadores de resistência aos antibióticos Ampicilina e Canamicina. Outro marcador de seleção é por IPTG/x-Gal. O sitio onde o produto de PCR é inserido fica dentro do gene da enzima β -lactosidade. Dessa forma, após a transformação as células são plaqueadas em meio com um antibiótico e Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), as colônias resultantes da transformação portam o vetor pCR 2.1 TOPO que confere resistência ao antibiótico. As colônias podem metabolizar ou não o X-Gal do meio pela liberação da transcrição de uma subunidade da enzima β -lactosidade pelo IPTG, se o vetor se ligar sem o inserto, esta subunidade se mantém íntegra sendo capaz de metabolizar este carboidrato e seu subproduto possui coloração azul. Já se o vetor se ligar a algum inserto, esta subunidade perde a funcionalidade e as células ficam incapazes de metabolizar o X-Gal, resultando em colônias com coloração branca.

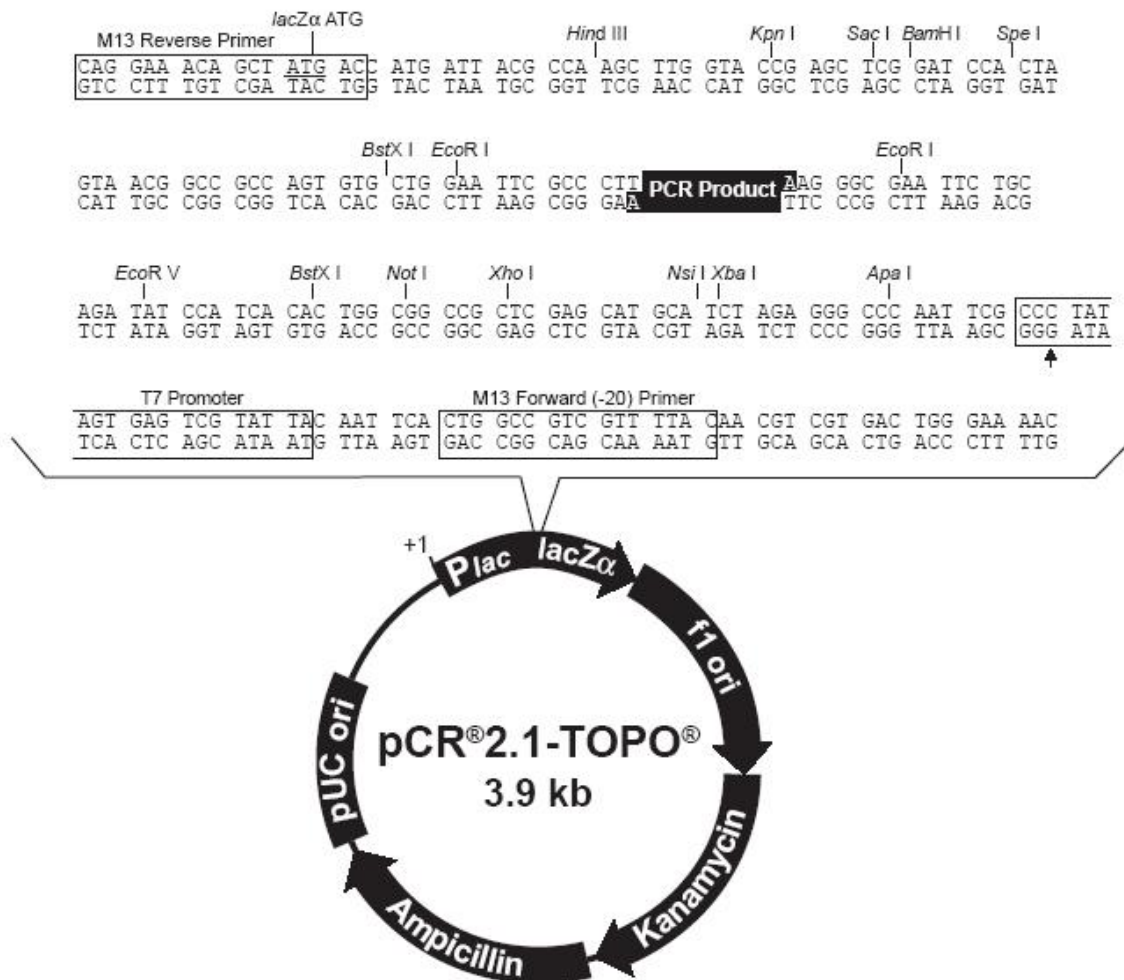


Figura 5: Mapa do vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO.

Em destaque sua origem de replicação, MCS, genes de resistência a ampicilina e canamicina e local de inserção do produto de PCR.

O vetores de expressão pET, comercializados pela Novagen, são caracterizados pela presença do forte promotor T7, que é capaz de produzir altos níveis de expressão da ORF clonada posterior a ele. A família pET possui uma ampla variedade de vetores que possuem várias proteínas de fusão para a auxílio da expressão da ORF de interesse.

O vetor pET-26b (Fig. 6) possui um amplo sítio múltiplo de clonagem (MCS), gene de resistência ao antibiótico canamicina e duas origens de replicação, f1 e a origem do vetor pBR322. Sua característica mais marcante é a presença do *pelB leader* como proteína de fusão que é um peptídeo sinal capaz de endereçar a proteína fusionada a ele ao periplasma bacteriano. Ao término do *pelB leader* existe um sítio de clivagem reconhecido pela *signal peptidase* endógena de *E. coli*, presente no periplasma, que cliva a proteína de fusão ligada a proteína alvo no periplasma, o que facilita a formação de pontes dissulfeto, uma vez que o espaço periplasmático possui características oxidativas, que facilitam a formação das pontes dissulfeto. Para a purificação este vetor possui uma cauda de histidina na porção c-terminal da proteína, facilitando a purificação em colunas de Níquel.

Já o vetor pET32c (Fig.7) também possui amplo MCS e gene de resistência ao antibiótico ampicilina e duas origens de replicação, f1 e a origem do vetor pBR322. Sua característica é a presença da Thiorredoxina (Trx) como proteína de fusão. A Trx fusionada a proteína de interesse aumenta a formação de pontes dissulfeto no citoplasma bacteriano, o que potencializa um correto dobramento protéico levando a correta atividade da proteína alvo, além disso, esta cauda pode aumentar muito a solubilidade de pequenas proteínas. Além da Trx, este vetor possui a cauda-S para detecção imunológica, que também pode ser utilizada na purificação. Entre as proteínas de fusão Trx e cauda-S, existe um sítio de clivagem para a protease trombina, entre a cauda-S e a proteína de interesse existe um sítio para a enteroquinase, para que seja retirada a cauda de fusão, obtendo assim uma proteína mais pura. De maneira semelhante ao vetor pET-26b este vetor também possui cauda de histidina na porção n-terminal e c-terminal da proteína de interesse para a purificação.

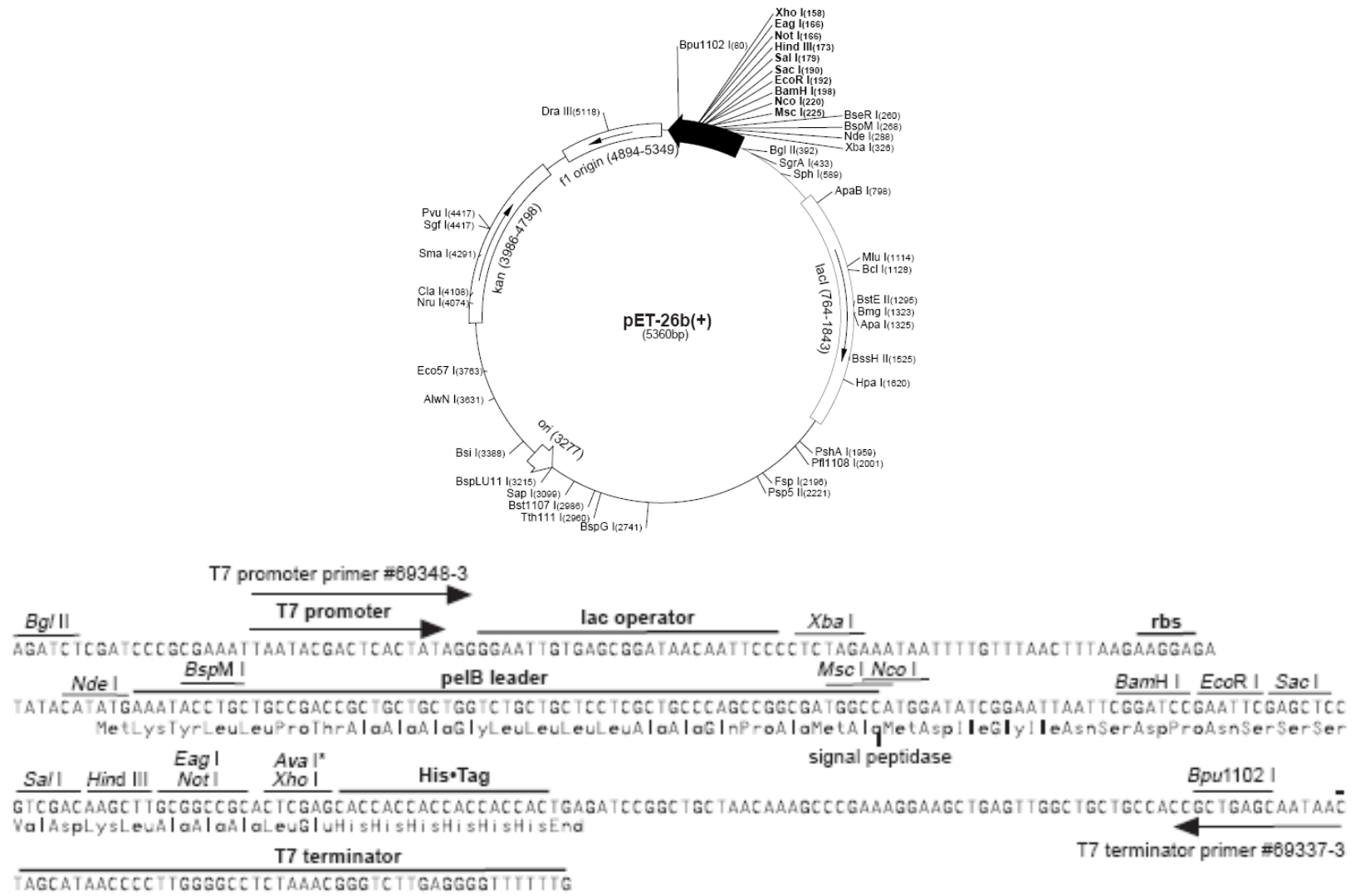
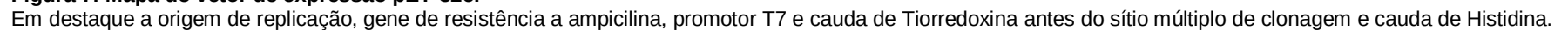


Figura 6: Mapa do vetor de expressão pET-26b.

Em destaque a origem de replicação, gene de resistência a canamicina, promotor T7 e peptídeo sinal *pelB leader* antes do sítio múltiplo de clonagem e cauda de Histidina.



6.4 Seleção das Linhagens de *Escherichia coli*

Foram selecionadas para este trabalho três linhagens de *Escherichia coli* para a expressão heteróloga.

As três linhagens selecionadas são designadas DE3, ou seja, possuem uma cópia do gene da RNA polimerase do fago T7 em seu genoma.

A linhagem Origami 2 (DE3) foi desenvolvida com o objetivo de expressão citoplasmática de proteínas heterólogas que possuam pontes dissulfeto para sua correta conformação tridimensional. Esta linhagem tem a característica de possuir duas mutações em redutases (gor⁻ e Trx⁻) que mantêm seu citoplasma oxidativo, o que promove a formação das pontes dissulfeto aumentando as chances de obtenção da correta estrutura tridimensional da Ts3.

As linhagens C41 (DE3) e C43 (DE3) foram selecionadas para este estudo por apresentam maior tolerância à expressão heteróloga de proteínas tóxicas as células hospedeiras. Estas linhagens derivam da BL21 (DE3) e possuem 1 e 2 mutações ainda não caracterizadas, respectivamente, que conferem a característica de resistência nestas linhagens. Além disso, estas linhagens apresentam alta capacidade de crescimento, suportando culturas de alta densidade celular.

6.5 Inserção de adaptadores a sequência da Ts3 por PCR

Para a clonagem da Ts3 nos vetores de expressão pET 26b e pET 32c, o inserto da Ts3 deveria conter às suas extremidades 5' e 3' sítios de reconhecimento de enzimas de restrição presentes no MCS dos vetores. Como a sequência do cDNA não continha tais sítios, estes foram adicionados por uma reação de PCR segundo Saiki *et. al* (1988).

Foram escolhidas as enzimas Nco I para flanquear a região 5' da Ts3 e a enzima Xho I para flanquear a extremidade 3' da Ts3. Para isso foi desenhado um par de iniciadores que continham estes sítios em suas extremidades 5', sendo que o iniciador direto portava o sítio de reconhecimento de Nco I e o reverso o sítio de Xho I (Tabela 4). Dessa maneira o produto de PCR resultante desta reação terá em suas extremidades estes sítios de reconhecimento. Além da inserção da sequência dos sítios de reconhecimento destas endonucleases, foi adicionado ao iniciador direto dois nucleotídeos AT entre o sítio de Nco I e a ORF da Ts3 para preservar a correta fase de leitura ao ser clonada nos vetores de expressão. Foram selecionados estes nucleotídeos para se manter o resíduo de ácido

aspártico presente na sequência do vetor a fim de não se obter problemas no processamento do *pelB leader* pela *E. coli*.

Tabela 4: Iniciadores utilizados para a inserção de adaptadores a ORF da Ts3.

Sublinhado as sequências dos sítios de restrição, em negrito os nucleotídeos usados para manter a correta fase de leitura.

Iniciador direto	5' - <u>CCATGG</u> AT AAGAAAGACGGATACCCGGTGG -3'
Iniciador reverso	5' - <u>CTCGAGGG</u> ATTTGCATTTTCCGTTGGTCTTGG -3'

A reação de PCR foi preparada como descrito abaixo:

Tampão IVb 5x	5 µL
DNTP's 1 Mm	2,5 µL
Taq DNA pol.	0,2 µL
Iniciador direto 20 pmol/µL	0,3 µL
Iniciador reverso 20 pmol/µL	0,3 µL
Água bidestilada	<u>16,7</u> µL
Volume final	25 µL

O tampão IVb e a enzima Taq DNA Polimerase são da marca Phoneutria. Os DNTP's são da marca Promega.

Foi usado o seguinte programa de termociclagem:

1. 95 °C por 4 minutos
2. 95 °C por 30 segundos
3. 58 °C por 30 segundos
4. 72 °C por 40 segundos
5. Os passos de 2 ao 5 foram repetidos por 30 vezes.
6. 72 °C por 5 minutos
7. 4 °C ∞

6.6 Resolução Eletroforética em Gel de Agarose

O gel de agarose 1,5% ou 0,8% foi preparado utilizando-se 1,5 g ou 0,8 g de agarose em pó e completado o volume para 100 mL com solução tampão TAE (40 mM Tris-HCl pH7,5; ácido acético 20mM, 1 mM EDTA pH 8,0) em seguida aquecido até a completa dissolução da agarose. Após a solução de agarose atingir temperatura adequada para ser manipulada, ela foi colocada em uma forma com a adição de um pente até sua completa solidificação. Para amostras em que o volume de DNA a ser aplicado no gel era grande, dois dentes do pente foram unidos com fita adesiva formando uma canaleta de tamanho maior. Após a solidificação do gel, foi retirado o pente e o gel colocado na cuba para eletroforese e coberto com tampão TAE.

A amostra de DNA foi acrescida de 1:10 do volume de tampão de amostra 10x (Phoneutria) e aplicado no gel, na canaleta ao lado foi aplicado o padrão de peso molecular para 100 pb (100 pb, Invitrogen), a eletroforese foi realizada durante aproximadamente trinta minutos com 100 V e 100 mA com potência de 8 W.

Após a resolução, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 10 mg/mL por aproximadamente 20 minutos e fotografado sobre uma fonte de luz ultravioleta (Sambrook, *et. al.*, 1989).

6.7 Purificação de DNA a partir de gel de Agarose

O procedimento de purificação de DNA a partir do gel de Agarose 1,5 % foi realizado como descrito pelo kit comercial “Wizard PCR Preps” da Promega:

A banda correspondente a Ts3 foi excisada do gel, após a eletroforese, com auxílio de uma lamina de bisturi e transferida para um microtubo (Axigen) de 1,5 mL. Foram adicionados 10 µL de solução “bind solution” para cada 10 mg de gel de Agarose, a seguir a mistura foi aquecida a 60 °C e agitada com auxílio de um vortex até a completa dissolução do gel.

A solução dissolvida foi transferida para uma mini-coluna, contida no kit, e centrifugada a 16.000 x *g* por 1 minuto. A coluna foi lavada com 700 µL de solução de lavagem e novamente centrifugada a 16.000 x *g* por 1 minuto, outra lavagem foi realizada com 500 µL de solução de lavagem e submetida novamente à centrifugação a 16.000 x *g* por 5 minutos.

A coluna foi deixada para secar a temperatura ambiente por 1 minuto e a seguir foram adicionados 30 µL de água aquecida para a eluição do DNA retido na coluna e centrifugada a seguir a 16.000 x *g* por 1 minuto, 1 µL do DNA eluído foi submetido à resolução eletroforética para quantificação e visualização da qualidade do DNA recuperado.

6.8 Subclonagem do Produto de PCR da Ts3 ao vetor PCR 2.1 TOPO

A ligação do produto de PCR correspondente a Ts3 ao vetor pCR 2.1 TOPO foi realizado como descrito pelo fabricante:

Foi adicionado a um tubo de 0,5 mL 3,0 µL de água, 1 µL do vetor pCR 2.1 TOPOa 50 µg/µL, 1 µL de solução salina (1,2 M de NaCl, 0,06 M de MgCl₂), 1 µL do inserto da Ts3 a 100 ng/µL. A reação de ligação possui volume final de 6 µL.

A ligação do inserto ao vetor ocorre pela enzima Topo Isomerase presente junto ao vetor linearizado. A reação foi incubada a 25 °C por 2 horas, logo em seguida foi realizada eletro-transformação da ligação a *E. coli* linhagem XL1 Blue.

6.9 Preparação de células eletrocompetentes

O protocolo a seguir foi utilizado para todas as linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho.

Uma única colônia isolada de *E. coli* foi inoculada em 1 mL de meio LB caldo (1 % de Peptona, 0,5 % de Extrato de levedura, 1 % de NaCl) e incubada por 16 horas sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm) a 37 °C. Após este período 100 µL da cultura, foram inoculados em 200 mL de meio LB caldo e novamente incubado a 37 °C sob agitação. A cada hora foi realizada a medição de densidade óptica (OD) com filtro de 600 nanômetros (nm) com espectrofotômetro até a cultura atingir a $OD_{600} = 0,6$.

Ao atingir a $OD_{600} = 0,6$ a cultura foi resfriada em banho de gelo e em seguida centrifugada a $3.000 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 mL de solução estéril de glicerol 10 % gelada e novamente centrifugadas como descrito e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido por 5 vezes (protocolo modificado). Ao final as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1,5 mL de solução estéril de glicerol 10 % gelada. Em seguida foram feitas alíquotas de 50 µL de células em microtubos de 0,5 mL (Axigen) e imediatamente congelados com gelo seco. As células foram conservadas a temperatura de – 80 °C.

6.10 Eletrotransformação Bacteriana

Uma alíquota de 50 µL de *E. coli* eletrocompetentes foram descongeladas em banho de gelo, após o descongelamento foi adicionado as células 100 ng de DNA plasmidial e deixado em repouso por 1 minuto em banho de gelo. Após este período as células foram transferidas cuidadosamente para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad). Durante todo este processo os recipientes das células foram mantidos em banho de gelo. A cubeta foi transferida para o eletroporador (Electroporator 2510, Eppendorf) e foi submetida a uma voltagem de 1800 mV, corrente de 25 µF, e resistência de 200 Ω, imediatamente foi adicionado as células 1 mL de meio de cultura SOC (2% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5% de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$, 20 mM de D-glicose) cuidadosamente as bactérias foram transferidas para um tubo de 15 mL e deixadas em repouso por 1 hora a 37°C.

Após este período as células foram transferidas para meio LB-ágar (1 % de Peptona, 0,5 % de Extrato de levedura, 1 % de NaCl, 2 % de ágar) fundido em uma placa de Petri com a devida concentração de antibióticos. Aos vetores resistentes a Ampicilina (Phoneutria) (pCR 2.1 TOPO e pET 32c) a concentração final de antibiótico no meio foi de 100 µg/mL e ao vetor pET 26b, resistente a Canamicina (Phoneutria), a concentração final no meio foi de 50 µg/mL do respectivo antibiótico.

A quantidade de 100 µL da cultura de suspensão celular foram espalhados sob o meio LB-ágar contido na placa de Petri com a ajuda de uma alça de Drigalski e mantida sob incubação por 16 horas a temperatura de 37° C a fim de se obter colônias recombinantes resistentes ao meio seletivo.

6.11 PCR de Colônia

Esta PCR tem o objetivo de diagnosticar colônias contendo vetores portadores de inserto em meio a colônias que contêm o vetor, contudo não o inserto da Ts3 de maneira mais rápida.

Foi preparada uma reação de PCR conforme a seguir:

Tampão IVb 5x	5 µL
DNTP's 1 mM	2,5 µL
Taq DNA pol.	0,2 µL
Iniciador direto 20 pmol/µL	0,3 µL
Iniciador reverso 20 pmol/µL	0,3 µL
Água bidestilada q.s.p.	<u>16,7</u> µL
Volume final	25 µL

Dez colônias isoladas foram coletadas com auxílio de uma ponteira estéril e transferidas para uma placa com LB-ágar com mapa numerado e as ponteiras foram inoculadas em 25 µL da solução de PCR descrita acima. Este procedimento foi realizado dentro de um fluxo laminar (Veco) previamente esterilizado.

A PCR foi submetida ao programa de termociclagem a seguir:

1. 95 °C por 4 minutos
2. 95 °C por 30 segundos
3. 58 °C por 30 segundos
4. 72 °C por 40 segundos
5. Os passos de 2 ao 5 foram repetidos por 30 vezes.
6. 72 °C por 5 minutos
7. 4 °C ∞

A reação de PCR de Colônia foi submetida à resolução eletroforética em gel de Agarose 1,5 % conforme descrito anteriormente.

6.12 Extração Plasmidial por Lise Alcalina

Uma colônia bacteriana isolada confirmadamente positiva obtida na placa com antibiótico devido, foi selecionada e inoculada em um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio LB-caldo com antibiótico adequado, que foi incubado sob agitação a temperatura de 37° C por 16 horas.

Após este período a cultura foi centrifugada a 3.000 x *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em 200 µL de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e transferido imediatamente para um microtubo de 1,5 mL e agitado com um auxílio de um vortex (Quimis). A seguir foi adicionado 300 µL de solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) e o tubo foi agitado por inversão até que a suspensão obtivesse uma consistência viscosa, caracterizando a lise celular. Foram adicionados 300 µL de solução III (300 mM de acetato de sódio, 11,5% de ácido acético glacial) e mantido sob leve agitação, a suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 minutos.

Os microtubos contendo a suspensão foram centrifugados a 16.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um microtubo de 1,5 mL novo. Foram adicionadas 0,6 vezes do volume do sobrenadante coletado com isopropanol 100 % (Merck) e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi centrifugada novamente a 16.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial precipitado ao fundo do tubo foi lavado duas vezes com 0,5 mL de etanol a 70%. A seguir o DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuscitado com uma solução de TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0) contendo 10 µg/mL de RNase e incubada a 37° C por 2 horas (Sambrook, *et. al.*, 1989).

Após este período o DNA plasmidial foi purificado pelo método de Fenol-Cloroformio. Foi adicionada a solução com o DNA plasmidial um volume de fenol e foi mantido sob forte agitação por 2 minutos, em seguida adicionada mais um volume de clorofórmio e mantido sob agitação por 2 minutos. A solução foi centrifugada a 10.000 x *g* e a fase superior formada pela solução de DNA plasmidial foi transferida para outro tubo e foi adicionado um volume de clorofórmio e mantido sob agitação por 2 minutos e novamente centrifugada como descrito anteriormente. A fase superior foi novamente recolhida e precipitada com 10% do volume de acetato de sódio a 3 M e 2 volumes de etanol absoluto e incubadas em banho de gelo por 20 minutos e a seguir centrifugada a 16.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado duas vezes com 0,5 mL de etanol a 70% e deixado secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de solução TE.

6.13 Quantificação do DNA Plasmidial

O DNA plasmidial contido em solução de TE foi aplicado em um gel de agarose 0,8% juntamente com uma amostra quantificada de DNA e submetido à resolução eletroforética conforme descrito anteriormente.

O padrão de intensidade de bandas foi comparado entre o DNA de referência e o DNA plasmidial para se estimar a quantidade de DNA aplicado e assim mensurar sua concentração na amostra (Sambrook, *et. al.*, 1989).

6.14 Reação de Sequenciamento

Para a reação de Sequenciamento a partir do DNA plasmidial foi utilizado 200 ng de vetor para cada reação (Sanger, *et. al.*, 1977). Foi adicionado a um microtubo de 0,5 mL 200 ng de vetor; 2 µL de iniciador a 0,8 pmol/µL; 0,5 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle; 1,5 µL de tampão BigDye Terminator v1.1; e água bidestilada para completar o volume final de 10 µL. Para o sequenciamento do vetor pCR 2.1 TOPO foram utilizados o iniciador M13 direto ou reverso e para os vetores pET foram utilizados os iniciadores T7 promotor ou T7 terminador (Tabela 5).

Tabela 5: Sequencias dos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento.

M13 direto	5' -GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13 reverso	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'
T7 promotor	5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 terminador	5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

As reações foram submetidas ao programa de termociclagem a seguir:

1. 96° C por 2 minutos
2. 96° C por 30 segundos, rampa de 1°C por segundo.
3. 50° C por 15 segundos, rampa de 1°C por segundo.
4. 60° C por 4 minutos
5. Os passos de 2 a 4 foram repetidos por 44 vezes.
6. 4 °C ∞

Após a termociclagem, as reações foram precipitadas como sugerido pelo fabricante:

Foi adicionado a reação de Sequenciamento 1 µL EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol absoluto. A solução foi agitada e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida a reação foi centrifugada a 3.300 x g por 25 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 35 µL de

etanol 70 % e novamente centrifugado a 2.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente.

O produto do Sequenciamento foi ressuscitado em 10 µL formamida de Hi-Dye e aplicado no sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

6.15 Análises das sequências obtidas

As sequências de nucleotídeos obtidas pelo Sequenciamento dos vetores foram analisadas pelo programa “Basic Local Alingment Search tool program for amino acids” – Blast – Gen Bank (Altschul *et. al.*, 1990) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

6.16 Digestão com Enzimas de Restrição

Após o Sequenciamento, um clone obtido contendo a *ORF* da Ts3 foi selecionado para o ensaio de restrição assim como os vetores pET 26b e pET 32c, utilizando-se as enzimas Nco I e Xho I (ambas da New England Biolabs).

Como estas enzimas apresentam tampões de reação muito diferentes foi realizado o corte primeiramente com a enzima Nco I e após o corte seguido de precipitação do DNA foi realizado a corte com a enzima Xho I.

Para cada 1 µg de DNA foi adicionado, 2 µL de tampão da enzima 10x, 1 unidade da enzima (0,1 µL), água bidestilada para completar o volume final de 20 µL.

Foram preparadas cinco reações totalizando um volume final de 100 µL . A reação foi incubada a 37° C durante 2 horas.

Após incubação, o produto das reações de corte da *ORF* referente à Ts3 e dos vetores de expressão pET 26b e pET 32c foram precipitadas e ressuscitadas em 10 µL de água bidestilada e aplicada a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

A banda correspondente a Ts3 e aos vetores linearizados foram purificados do gel de agarose com o kit “Wizard PCR Preps” individualmente e quantificados conforme descrito anteriormente.

6.17 Ligação *ORF* da Ts3 aos Vetores pET 26b e pET 32c

Para a ligação *ORF* da Ts3 aos vetores pET 26b e pET32c foi realizado segundo o protocolo do fabricante da enzima T4 DNA Ligase. Foram realizadas seis reações de ligação com variação na quantidade de inserto conforme a tabela 6.

Tabela 6: Reação de ligação da ORF da Ts3 aos vetores pET26-b e pET-32c

Reagentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Vetor (100 ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Tampão 10x	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
150 u/ μ L de T4 DNA Ligase	0,1 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L
Ts3 (50 ng/ μ L)	0,5 μ L	1 μ L	2 μ L	3 μ L	4 μ L	5 μ L
Água q.s.p.	7,4 μ L	6,9 μ L	5,9 μ L	4,9 μ L	3,9 μ L	2,9 μ L

Esta reação foi realizada com volume final de 10 μ L e foi incubada a 4 °C por 16 horas. Em seguida as reações de ligação foram unidas em um único tubo e precipitadas com 10 % do volume de solução de acetato de sódio a 3 M e 2 volumes de etanol absoluto. O produto de ligação precipitado foi ressuspensionado em 10 μ L de água bidestilada e 5 μ L foram eletrotransformados em *E. coli* XL1 Blue como descrito anteriormente.

6.18 Expressão piloto da Ts3

Após o Sequenciamento dos vetores pET 26b e pET 32c contendo o inserto da Ts3, foi feita uma eletrotransformação dos vetores nas linhagens de *E. coli* Origami (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3) de acordo como descrito anteriormente.

As colônias resultantes foram transferidas para outra placa de Petri numerada. Cinco colônias foram pré-inoculadas individualmente em 1 mL de meio 2xYT caldo (1% de peptona, 1,6% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl) contendo 100 μ g/mL ampicilina para a construção pET32/Ts3 ou 50 μ g/mL de canamicina para a construção pET26/Ts3 e mantidas sob incubação a 37 °C com agitação de 200 rpm durante 16 horas.

Foram testados para cada linhagem e vetor, a variação no tempo de expressão (16 ou 4 horas), temperatura (37°C ou 25°C), indução ou não por IPTG. De maneira geral, 10 μ L do pré-inóculo descrito acima foram adicionados a tubos cônicos de 50 mL com 10 mL de meio 2xYT com antibiótico e incubados sob agitação de 200 rpm.

O tempo de expressão foi definido como momento entre a indução por IPTG e o término de incubação.

Na expressão com duração de 16 horas, 10 μ L de pré-inóculo foram adicionados a dois tubos distintos, um tubo contendo 10 mL de meio 2xYT e 600 μ M de IPTG e o segundo tubo com 10 mL de meio 2xYT sem a presença de IPTG, ambos com a devida concentração de antibiótico. Este procedimento foi realizado para as temperaturas de 25 °C e 37 °C.

Já a expressão com duração de 4 horas, 50 µL de pré-inóculo foram adicionados a dois tubos com 10 mL de meio 2xYT com antibiótico e incubados a 37°C até atingirem a $OD_{600} = 0,6$, neste momento foi adicionado IPTG em um dos tubos com concentração final de 600 µM e a cultura continuou sobre agitação de 200 rpm a 37°C ou 25°C por mais 4 horas.

As melhores condições para a expressão foram mantidas na expressão em escala de 1 litro de meio 2xYT.

6.19 Resolução Eletroforética SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante SDS- PAGE (Laemmli, 1970) preparado em placas de vidro com dimensão de 10,0 x 8,0 x 0.2 cm, com espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação era constituído de 18% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0.05 % (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4 % (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0.1% (p/v); (PSA) 50 mM e TEMED 0.025% (v/v). O gel de separação era preparado e colocado entre as placas de vidro, ao se polimerizar era preparado o gel de concentração que foi colocado sobre o gel de separação. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante 2x para SDS-PAGE (100 mM de Tris-HCl pH:6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de β-mercaptoetanol; 20% de Glicerol) com redução e fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese SDS-PAGE (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 100 V, 24 mA, durante 3 a 4 horas. Após eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Comassie Blue (0,25% de Comassie Blue, 45% de metanol, 9% ácido acético glacial) por 45 minutos (25°C) e lavados em solução descorante (45% metanol e 9% ácido acético glacial) até o desaparecimento da coloração de fundo.

6.20 Lise de Choque Osmótico

Após a expressão, a cultura era centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos para a precipitação das bactérias, em seguida as células eram ressuspensas em solução hipertônica (20% de sacarose, 30 mM de Tris-HCl, pH 8,0). Para cada 80 mL de cultura inicial era adicionado 10 mL desta solução. Em seguida era adicionado 20 µl de EDTA 0,5 M e as células mantidas sob agitação durante 10 minutos. Depois as bactérias eram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado era

ressuspendido em 1,5 mL de solução hipotônica (5 mM MgSO_4) gelada e mantido sob agitação em banho de gelo por 10 minutos seguidos de centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante era recolhido.

Este tipo de lise tem como objetivo a extração das proteínas exportadas para o espaço periplasmático da bactéria e foi usado apenas na expressão utilizando-se o vetor pET 26b (Ausubel *et. al.* 1989).

6.21 Lise para purificação com coluna de Níquel em condições não desnaturantes

A cultura bacteriana foi centrifugada a $3.000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 5 mL de tampão de lise (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, pH: 8) para cada grama de peso úmido de células precipitadas. Esse processo foi repetido duas vezes para a lavagem das células e para a retirada dos restos de meio de cultura. Foi adicionado mais 5 mL de tampão de lise com 4mg/mL de Lisozima e as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida estas células foram incubadas com gelo seco e após este processo descongeladas. Esse processo foi repetido por três vezes até que as células apresentassem lise, caracterizado por extrema viscosidade da solução de células. As células passaram por três ciclos de sonicação com três pulsos de 40% de amplitude e duração de 30 segundos.

6.22 Teste de solubilidade da Ts3 recombinante

Após a expressão da Ts3 recombinante foi realizado o teste de solubilidade. O lisado bacteriano foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C , o sobrenadante e o precipitado foram coletados separadamente para análise em gel SDS-PAGE para avaliar em qual fração está a maior concentração da Ts3 recombinante. A purificação da Ts3 recombinante foi realizada com a fração correspondente ao sobrenadante em coluna de níquel.

6.23 Purificação da Ts3 em Condições não desnaturantes com Resina de Níquel

A cada 4 mL de sobrenadante recolhido foi adicionado 1 mL de resina de níquel e mantido sobre agitação por 2 horas em banho de gelo.

A solução foi transferida para uma coluna estéril e inerte. Foi recolhida uma amostra não ligada à coluna. Em seguida a coluna foi lavada com 10 mL de solução de lavagem (50

mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, pH: 8). A amostra com a cauda de histidina foi recolhida com 5 mL solução de eluição (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 250 mM de imidazol, pH: 8), coletadas em 5 alíquotas. Após a purificação as amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE.

É importante que a resina não seque. A resina de Níquel pode ser utilizada cinco vezes antes de ser regenerada.

6.24 Digestão da Ts3 purificada com Enteroquinase

A Ts3 expressa no vetor pET32c purificada em condições nativas em coluna de níquel passou pelo método de diálise contra solução de corte da enteroquinase (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2) (New England Biolabs), a seguir 1 unidade de enzima foi adicionada a cada 1 μg Ts3 e incubado por 24 horas a 25 °C. A eficiência do corte foi observada em resolução eletroforética SDS-PAGE.

6.25 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

As dosagens de proteína foram realizadas utilizando o método descrito por Bradford (1976).

Foi utilizada uma placa de cultura de células de 96 poços. A primeira coluna foi separada para o branco e a segunda para o padrão. Na primeira coluna, foi adicionado em todos os poços 20 μL de tampão no qual sua amostra a ser dosada está diluída. Na segunda coluna, adicionar em duplicata, o padrão: solução de BSA 1 mg/mL diluída 1:5, de acordo com o seguinte protocolo:

- 5 μL de padrão + 15 μL de tampão (1 μg)
- 10 μL de padrão + 10 μL de tampão (2 μg)
- 15 μL de padrão + 5 μL de tampão (3 μg)
- 20 μL de padrão (4 μg)

Foram feitas diluições seriadas em duplicata das amostras a serem quantificadas nas outras colunas, sempre mantendo o volume final de amostra de 20 μL . Foi acrescentado 180 μL de Reagente de Bradford a todos os poços. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 600 nm.

A curva do padrão foi feita no programa Excel usando regressão linear, a equação da reta foi utilizada para calcular a quantidade de amostra e posteriormente a sua concentração. Usar somente as absorbâncias das diluições que se encontrarem dentro do limite mínimo e máximo imposto pelo padrão. Equação da reta: $y = Bx + A$ Então, $x = y - A/B$

Sendo que y é a absorbância e o x é a quantidade de proteína. O eixo y contém as absorbâncias obtidas do padrão e no eixo do x as quantidades: 1, 2, 3 e 4 μg . Após calcular a quantidade de proteína da amostra ($x = y - A/B$), calcular a concentração em mg/mL e multiplicar pelo fator de diluição.

6.26 Imunização de Coelhos com Ts3 expressa em pET 26b

Coelhos machos foram utilizados para a imunização da Ts3 expressa em pET 26b, e um coelho foi utilizado para a imunização com veneno total de *Tityus serrulatus*. Os coelhos tiveram uma área de 4 cm x 5 cm do dorso depilado para a aplicação dos antígenos. Antes dos ciclos de imunização foi coletado o soro pré-imune dos coelhos.

A primeira imunização foi feita com 1 mL de adjuvante completo de Freund's e 100 μg de antígeno (pET26/Ts3 purificada ou veneno bruto). O Adjuvante foi misturado ao antígeno até a obtenção de uma consistência espessa. Em seguida a mistura adjuvante-antígeno foi aplicada intradermicamente em quatro pontos no dorso do coelho. Após quinze dias da primeira imunização foi feita a segunda dose com 150 μg de antígeno. Depois de sete dias da segunda dose foram realizados mais cinco doses em intervalos de sete dias com 150 μg de antígeno como descrito na tabela 7. Apenas o coelho imunizado com pET26/Ts3 recebeu sete doses enquanto o coelho que recebeu veneno bruto de *T. serrulatus* recebeu cinco doses (Mendes, *et. al.*, 2004).

Tabela 7: Imunização dos coelhos

Com pET26/Ts3					
	<i>Adjuvante de Freund's</i>	<i>Dose de Antígeno</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Dia do Experimento</i>	<i>Dia da Sangria</i>
1ª Dose	Completo	150 μg	pET26/Ts3	0	-
2ª Dose	Incompleto	150 μg	pET26/Ts3	15	-
3ª Dose	Incompleto	150 μg	pET26/Ts3	22	21
4ª Dose	Incompleto	150 μg	pET26/Ts3	29	28
5ª Dose	Incompleto	150 μg	pET26/Ts3	36	35
6ª Dose	Incompleto	150 μg	pET26/Ts3	51	57
7ª Dose	Incompleto	150 μg	Veneno bruto	58	65
Com veneno bruto					
	<i>Adjuvante de Freund's</i>	<i>Dose de Antígeno</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Dia do Experimento</i>	<i>Dia da Sangria</i>
1ª Dose	Completo	150 μg	Veneno bruto	0	-
2ª Dose	Incompleto	150 μg	Veneno bruto	15	-
3ª Dose	Incompleto	150 μg	Veneno bruto	22	21
4ª Dose	Incompleto	150 μg	Veneno bruto	29	28
5ª Dose	Incompleto	150 μg	Veneno bruto	36	35

6.27 Sangria dos Coelhos

Uma das orelhas dos coelhos foi lavada com etanol a 70%. Foi passado Xilol na ponta da orelha para estimular a circulação local e quando a veia marginal aumentou de calibre foi feita uma pequena incisão na veia. Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue em um tubo de cônico plástico com volume de 15 mL, em seguida o sangue foi estancado, não foi adicionado anticoagulante.

6.28 Preparação do Soro dos Coelhos

O sangue recém coletado foi mantido a 4 °C por 2 horas para total coagulação. Com o auxílio de uma haste de metal estéril os coágulos foram descolados da parede do tubo em seguida centrifugados a 2.000 x g durante 20 minutos a temperatura de 4 °C.

O soro, fase superior líquida, foi coletado em outro frasco e centrifugado novamente em microtubos de 1,5 mL a 16.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido em alíquotas de 1 mL e em seguida congelado a -20 °C.

6.29 ELISA

A placa de ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL de antígenos diluídos em tampão carbonato (15 mM de Na₂CO₃, 35 mM de NaHCO₃, pH da solução 9,6) com volume final de 100 µl por poço e incubado durante 16 horas a 4°C. A placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem para ELISA (0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20). Em seguida a placa foi bloqueada com 100 µl de solução de bloqueio (2% de caseína em tampão salina fosfato-PBS) e incubada a 37 °C por 1 hora. Após duas lavagens com solução de lavagem, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora com soro imune e pré-imune com diluições seriadas em tampão de incubação (0,2% de caseína em PBS e 0,05% de Tween 20). A placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem e incubada a 37°C por 1 hora com conjugado anti-IgG de coelho ligado a peroxidase e diluído 1:5.000 em tampão de incubação. A placa foi novamente lavada seis vezes e em seguida adicionada 100 µl por poço de solução de substrato [10 mL de tampão citrato (50 mM de Na₂HPO₄, 24 mM de ácido cítrico, pH da solução 5,0), 2 mg de Ortho-Phenylene-Diamina (OPD), 2 µL de peróxido de hidrogênio 30%]. A placa foi deixada 20 minutos abrigada da luz e a reação foi interrompida com 20 µl por poço de H₂SO₄ diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 492 nm em leitor de ELISA. Todas as amostras foram feitas em duplicata. Como controle negativo foi utilizado o extrato solúvel da expressão da linhagem Origami, portanto o vetor pET26b sem inserto para a Ts3 recombinante, para a imunização

com o veneno bruto foi utilizado o valor do soro pré-imune. Os valores finais da titulação foram deduzidos pela subtração dos valores dos controles (Mendes *et. al.*, 2004).

A placa de ELISA foi sensibilizada com os antígenos para testar o reconhecimento do soro a eles. Foram utilizados a Ts3 nativa, pET26/Ts3, pET32/Ts3 e o veneno bruto para a sensibilização da placa na concentração de 5 µg/mL diluídos em tampão carbonato.

Foram testados os soros anti-Ts3, anti-Ts3 com uma dose de veneno bruto e soro anti-veneno bruto na concentração de 1:500.

6.30 Western Blot

As amostras protéicas foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm - SIGMA), sob corrente de 100 V 350 mA por 12 horas. As proteínas foram então submetidas ao reconhecimento do anticorpo primário como descrito por Guatimosin *et. al.* (2000). A membrana foi bloqueada por 1h em PBS contendo 0,3% de Tween 20. A membrana de nitrocelulose foi lavada três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e incubadas por uma hora e meia em temperatura ambiente com soro imune de interesse. A seguir a membrana foi novamente lavada como anteriormente e adicionou-se o anticorpo conjugado na diluição de 1:2.500 em PBS. A membrana foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST e duas lavagens com PBS 1x a reação foi revelada pela adição do substrato da peroxidase ligada ao conjugado contendo 0,5 mg/mL de diaminobenzidine (DAB) e 0,25 mg/mL de 4-cloronaftol, 8% de metanol e 0,042% de H₂O₂ 30% (Towbin *et. al.*, 1979).

6.31 Determinação da DL₅₀

Para a determinação da DL₅₀ doses crescentes de veneno segundo um fator, no caso deste estudo 1.3, são inoculadas em grupos de camundongos com peso entre 18 g e 22 g, após 24 horas são contadas as mortes e processado o cálculo da DL₅₀ realizado pelo método de probitos. As doses do veneno são misturadas a uma solução de PBS/1% de albumina bovina (BSA), totalizando 100 µl de veneno em PBS/BSA que são inoculados em cada camundongo (Karber, 1937).

Foram utilizados para este experimento 36 camundongos Swiss com peso entre 18 g e 22 g. Foram separados aleatoriamente em seis grupos com seis indivíduos cada. Um grupo recebeu apenas a solução de PBS/BSA 1% como controle (C-). Os outros cinco grupos receberam doses crescentes de veneno conforme a tabela 8.

Tabela 8: Doses de veneno para a determinação da DL₅₀

Grupos	Dose de Veneno Fator 1.3
1	0 (C-)
2	2,50
3	3,25
4	4,23
5	5,49
6	7,14

6.32 Teste Toxicidade da Ts3 em Camundongos

Foram utilizados 20 camundongos swiss fêmeas divididas em cinco grupos. Foi inoculado no primeiro grupo 100 µl de solução de eluição para purificação de proteínas com cauda de histidina em condições nativas. No segundo grupo foi inoculado 100 µg de pET26/Ts3. No terceiro grupo 100 µg de pET32/Ts3. No quarto grupo 100 µg de pET32/Ts3 cortada pela enteroquinase e por fim, no quinto grupo 2 DL₅₀ de veneno bruto de *T. serrulatus*. Os camundongos ficaram sob observação durante 24 horas.

6.33 Ensaio de neutralização

A soroneutralização foi realizada conforme Mendes *et. al.*, 2008. Testando a capacidade de proteção dos soros hiperimunes contra, 1 e 2 DL₅₀'s do veneno bruto de *T. serrulatus* (o valor da DL₅₀ foi determinado anteriormente ao ensaio). Foram utilizados os soros pré-imune, anti-pET26/Ts3, anti-pET26/Ts3 + veneno bruto e o soro anti-veneno bruto de *T. serrulatus*. Como controle utilizou-se solução de PBS/BSA 1%. Foram usados cinco grupos com quatro camundongos Swiss fêmeas (18-22 g). Foram incubados 100 µl de soro hiperimune de coelho por 1 hora a 37°C com 1 ou 2 DL₅₀'s de veneno bruto, em seguida o soro + veneno foi inoculado via subcutânea nos camundongos. A contagem de sobreviventes foi realizada após 24 horas (Karber, 1937).

6.34 SPOT

Foi utilizada uma membrana de celulose contendo as sequências de aminoácidos sintetizados a partir das sequências de três toxinas (Ts1, Ts2 e Ts3) e uma proteína (TsNTxP) do veneno de *T. serrulatus* (Tabela 9).

Tabela 9: Mapa dos epítomos representados na membrana de SPOT

Epítomos	TsNTxP	Ts1	Ts2	Ts3
1	GREGYPADSKGCKIT	KEGYLMDHEGCKLSC	KEGYAMDHEGCKFSC	KKDGPVEYDNCAYI
2	REGYPADSKGCKITC	EGYLMDHEGCKLSCF	EGYAMDHEGCKFSCF	KDGPVEYDNCAYIC
3	EGYPADSKGCKITCF	GYLMDHEGCKLSCFI	GYAMDHEGCKFSCFI	DGPVEYDNCAYICW
4	GYPADSKGCKITCFL	YLMDHEGCKLSCFIR	YAMDHEGCKFSCFIR	GYPVEYDNCAYICWN
5	YPADSKGCKITCFLTA	LMDHEGCKLSCFIRP	AMDHEGCKFSCFIRP	YPVEYDNCAYICWNY
6	PADSKGCKITCFLTA	MDHEGCKLSCFIRPS	MDHEGCKFSCFIRPA	PVEYDNCAYICWNYD
7	ADSKGCKITCFLTAA	DHEGCKLSCFIRPSG	DHEGCKFSCFIRPAG	VEYDNCAYICWNYDN
8	DSKGCKITCFLTAAG	HEGCKLSCFIRPSGY	HEGCKFSCFIRPAGF	EYDNCAYICWNYDNA
9	SKGCKITCFLTAAGY	EGCKLSCFIRPSGYC	EGCKFSCFIRPAGFC	YDNCAYICWNYDNAY
10	KGCKITCFLTAAGYC	GCKLSCFIRPSGYCG	GCKFSCFIRPAGFCD	DNCAYICWNYDNAYC
11	GCKITCFLTAAGYCN	CKLSCFIRPSGYCGR	CKFSCFIRPAGFCDG	NCAYICWNYDNAYCD
12	KITCFLTAAGYCNT	KLSCFIRPSGYCGRE	KFSCFIRPAGFCDGY	CAYICWNYDNAYCDK
13	KITCFLTAAGYCNT	LSCFIRPSGYCGREC	FSCFIRPAGFCDGYC	AYICWNYDNAYCDKL
14	ITCFLTAAGYCNT	SCFIRPSGYCGRECG	SCFIRPAGFCDGYCK	YICWNYDNAYCDKLC
15	TCFLTAAGYCNT	CFIRPSGYCGRECGI	CFIRPAGFCDGYCKT	ICWNYDNAYCDKLC
16	CFLTAAGYCNT	FIRPSGYCGRECGIK	FIRPAGFCDGYCKTH	CWNYDNAYCDKLC
17	FLTAAGYCNT	IRPSGYCGRECGIKK	IRPAGFCDGYCKTHL	WNYDNAYCDKLC
18	LTAAGYCNT	RPSGYCGRECGIKKG	RPAGFCDGYCKTHLK	NYDNAYCDKLC
19	TAAGYCNT	PSGYCGRECGIKKGS	PAGFCDGYCKTHLKA	YDNAYCDKLC
20	AAGYCNT	SGYCGRECGIKKGS	AGFCDGYCKTHLKAS	DNAYCDKLC
21	AGYCNT	GYCGRECGIKKGS	GFCDGYCKTHLKASS	NAYCDKLC
22	GYCNT	YCGRECGIKKGS	FCDGYCKTHLKASSG	AYCDKLC
23	YCNTE	CGRECGIKKGS	CDGYCKTHLKASSGY	YCDKLC
24	CNTE	GREGCGIKKGS	DGYCKTHLKASSGYC	CDKLC
25	NTE	RECGIKKGS	GYCKTHLKASSGYCA	DKLC
26	TE	ECGIKKGS	YCKTHLKASSGYCAW	KLCK
27	ECT	CGIKKGS	CKTHLKASSGYCAWP	LCK
28	CTL	GIKKGS	KTHLKASSGYCAWPA	CKD
29	TL	IKKGS	THLKASSGYCAWPAC	KDK
30	LK	KGSSGYCAWPAC	HLKASSGYCAWPAC	DKK
31	KK	KGSSGYCAWPAC	LKASSGYCAWPAC	KK
32	KG	GSSGYCAWPAC	KASSGYCAWPAC	K
33	G	SSGYCAWPAC	ASSGYCAWPAC	AD
34	S	SGYCAWPAC	SSGYCAWPAC	DS
35	SG	GYCAWPAC	SGYCAWPAC	SG
36	GY	YCAWPAC	GYCAWPAC	GY
37	Y	CAWPAC	YCAWPAC	Y
38	CA	AWPAC	CAWPAC	C
39	AW	WPAC	AWPAC	W
40	WP	PAC	WPAC	W
41	P	AC	PAC	P
42	AC	CY	AC	H
43	CY	YGL	CY	I
44	Y	CYGL	Y	L
45	CYGL	YGLPN	CYGL	C
46	YGLPN	YGLPNW	YGLPN	C
47	YGLPNW	YGLPNWV	YGLPNW	C
48	YGLPNWV	YGLPNWV	YGLPNWV	C
49	YGLPNWV	YGLPNWV	YGLPNWV	C
50	YGLPNWV	YGLPNWV	YGLPNWV	C

Esta membrana possui os epítomos lineares com 15 aminoácidos e janela de um aminoácido por sequência. Desta maneira a membrana apresenta todos epítomos lineares de 15 aminoácidos possíveis para estas toxinas. Esta membrana foi gentilmente cedida pelo professor Carlos Delfim Chávez-Olórtegui do departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

O procedimento de SPOT foi realizado segundo Duarte *et. al.* 2010. A membrana foi incubada por cinco minutos com PBS 1x e em seguida bloqueada com PBS com 0,1% de

Tween 20 e 3% de BSA por uma hora seguida uma lavagem por 10 minutos com PBS 0,1% Tween 20. Foi acrescido então o soro imune de interesse na diluição de 1:500 em PBS 0,1% Tween 20 e incubado sob agitação por 2 horas a 37 °C.

Após incubação com soro imune de interesse foram realizadas três lavagens com PBS com 0,1% Tween 20 e acrescido IgG anti coelho conjugada a fosfatase alcalina na diluição de 1:5.000 e incubado sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente seguida de duas lavagens com PBS 0,1% Tween 20 por 10 minutos e 2 lavagens com tampão CBS (137 mM de NaCl, 3 mM de KCL, 10 mM de ácido cítrico monohidratado, pH: 7,0) durante 10 minutos.

A membrana foi revelada pela adição do substrato colorimétrico (120 µl de thiazolyl blue tetrazolium bromide 120 mM dissolvido em dimetilformamida 70%, 100 µl de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 160 mM e 80 µl de MgCl₂ 1 M, diluídos em 20 mL de tampão CBS) e mantido sob agitação durante 15 minutos para o aparecimento da coloração sobre os epítomos reativos.

Logo depois da fotografia da membrana, ela foi regenerada com uma lavagem de dimetilformamida até o desaparecimento da coloração da membrana, seguido de três lavagens com a solução A (8 M de uréia, 1% SDS) por 10 minutos seguida de três lavagens em solução B (50% etanol, 10 % ácido acético) e uma lavagem de 10 minutos com metanol. Após a regeneração a membrana pode ser seca e reutilizada por várias vezes. Foram utilizados neste experimento três soros diferentes: anti-pET26/Ts3, anti-pET26/Ts3 com uma dose de veneno bruto de *T. serrulatus* e soro anti-veneno bruto de *T. serrulatus*.

A análise fotométrica foi realizada com o auxílio do programa "ImageJ" disponível na internet *on line* em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>. Cada ponto da membrana foi quantificado em relação à intensidade de coloração. Foi calculado o valor do plano de fundo da membrana pela média de quatro pontos aleatórios da membrana, não sobrepostos sobre os pontos contendo as amostras. Os valores totais foram subtraídos pelo valor do plano de fundo. Valores negativos depois da subtração do valor do plano de fundo foram considerados nulos. Com a obtenção dos valores reais para cada ponto, estes foram transformados em porcentagem de atividade em relação ao ponto mais forte de cada membrana que possui o valor de 100 %.

7. Resultados

7.1 PCR para inserção de adaptadores

A partir da biblioteca da glândula de veneno de *T. serrulatus* presente em nosso laboratório, Thaís Melo Mendes, em sua tese de doutorado, isolou e sequenciou o clone correspondente ao cDNA da Ts3 e de outras toxinas. A biblioteca de cDNA foi feita utilizando o vetor pBluescript por Kalapothakis, *et. al.* (2001).

O clone contendo o cDNA da Ts3 foi amplificado por reação de PCR com os iniciadores Ts3-NcoI F e Ts3-XhoI R. Estes iniciadores possuem em suas extremidades 5' a sequência do sítio de reconhecimento das enzimas de restrição NcoI e XhoI, apenas a sequência correspondente a toxina madura foi amplificada.

A sequência madura da Ts3 possui tamanho de 192 pb, porém, com a adição de adaptadores para as enzimas NcoI e XhoI o comprimento do produto de PCR é de 206 pb.

Os produtos de PCR correspondentes a Ts3 (fig. 8) foram resolvidos em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio.

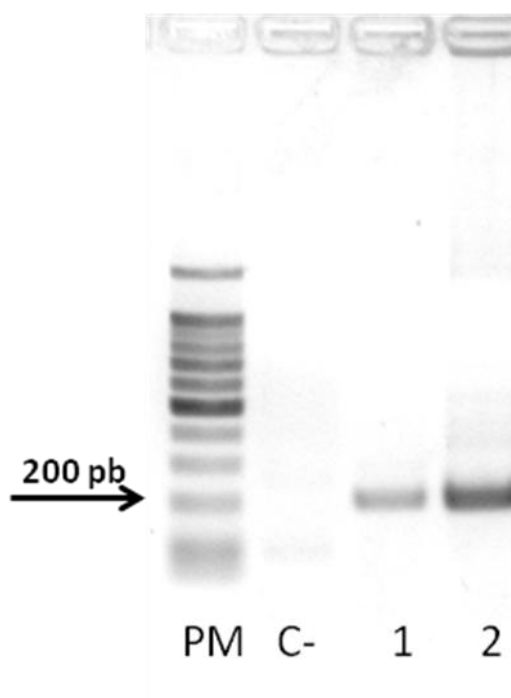


Figura 8: PCR para inserção de adaptadores a ORF da Ts3.

Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio da PCR para adição de adaptadores a ORF da Ts3. (PM), padrão de peso molecular; (C-), controle negativo; (1 e 2), 5 e 10 µl de produto de PCR da Ts3, respectivamente; a seta indica o peso molecular de 200 pb.

7.2 Clonagem da ORF da Ts3 no vetor pCR 2.1 TOPO

Após testes de amplificação, foi realizada uma reação de PCR com 10 tubos, totalizando 250 µl de volume de PCR. Após a termociclagem, os produtos de PCR foram reunidos em um tubo e precipitados com 1/10 de acetato de sódio e dois volumes de etanol absoluto. O produto de PCR precipitado foi ressuspensionado em 10 µl de água bidestilada e resolvido em gel de agarose 1,5%. Após resolução, a banda correspondente a Ts3 foi purificada pelo kit “Wizard PCR Preps” e ligada ao vetor pCR 2.1 TOPO conforme descrito anteriormente.

O produto de ligação foi transformado em *E. coli* XL1Blue eletrocompetentes, e 12 colônias brancas foram selecionadas para a realização de PCR de colônia para verificação da clonagem em vetor PCR 2.1 TOPO, utilizando os iniciadores desenhados para a Ts3.

Dentre as 12 colônias selecionadas, apenas uma não apresentou a correta ligação da ORF da Ts3 ao vetor, apresentando eficiência de 91,6% de colônias transformadas com vetor ligado ao inserto (Fig. 9). Após a PCR os clones positivos foram crescidos em 10 mL de meio LB caldo com antibiótico e incubados por 16 horas para a realização de extração plasmidial.

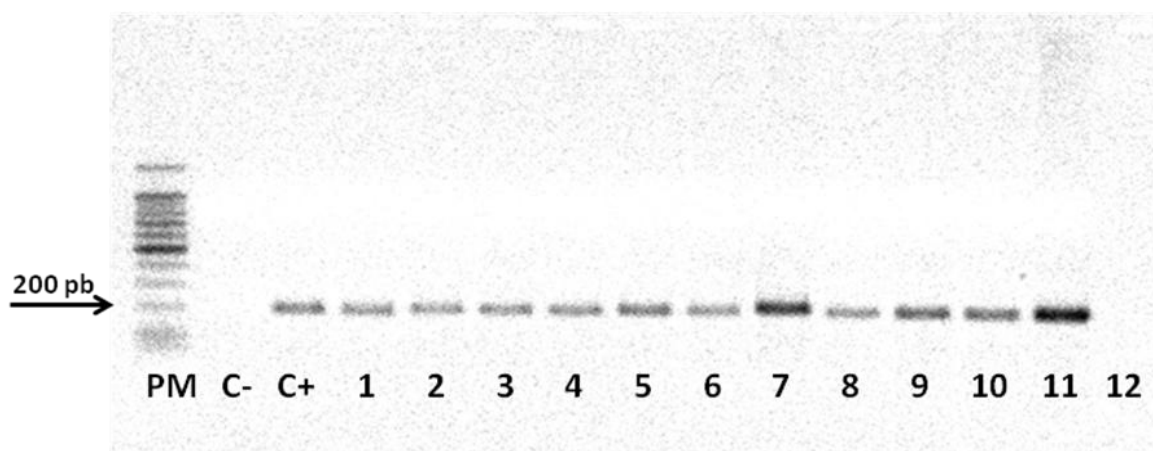


Figura 9: PCR de colônia para confirmação da ligação da ORF da Ts3 em pCR 2.1 TOPO.

Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio apresentando o resultado da PCR de 12 colônias obtidas após a transformação da ligação da Ts3 em pCR 2.1 TOPO. (PM), padrão de peso molecular; (C-), controle negativo da PCR; (C+), controle positivo da PCR; (1 a 12) clones submetidos à reação de PCR para a confirmação da ligação da ORF da Ts3 em pCR 2.1 TOPO; A seta indica o peso molecular de 200 pb.

7.3 Sequenciamento da ligação da ORF da Ts3 ao vetor pCR 2.1 TOPO

Dentre os clones positivos para a PCR, quatro foram submetidos à reação de Sequenciamento para a verificação da integridade da sequência e correta ligação ao vetor.

Através deste processo identificou-se a correta sequência da ORF da Ts3, além dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição (Fig. 10). Todas as sequências obtidas apresentaram picos satisfatórios e ausência de linha de base alta, conferindo alta confiabilidade dos resultados. O vetor pCR 2.1 Topo portando a *ORF* da Ts3 foi chamado de pCR/Ts3 para facilitar a identificação desta construção.

>pCR 2.1 TOPO/TsTx

```
ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTA
AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTT
ATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCT
TTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTG
AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
GGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGG
CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCA
CTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTC
GGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTCCATGGATAAGAAAGACGGAT
ACCCGGTGGAATACGATAACTGCGCCTACATTTGCTGGAACTACGACAACGCTTACTGCGATAA
GCTGTGCAAAGACAAGAAAGCCGATAGCGGATATTGTTACTGGGTTACATCCTGTGCTACTGC
TACGGGCTTCCCGATAGCGAACCAGCAAGACCAACGGAAAATGCAAATCCCTCGAGAAGGGCG
AATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAA
```

Figura 10: Sequenciamento do vetor pCR2.1 TOPO contendo a ORF da Ts3.

Sequência em formato FASTA apresentando o resultado do sequenciamento do vetor pCR/Ts3. Em destaque os sítios de reconhecimento de NcoI e XhoI, respectivamente, sublinhado dois nucleotídeos adicionados para obtenção da correta fase de leitura e em negrito a sequência da ORF da Ts3 madura.

As sequências geradas foram alinhadas com o banco de dados GeneBank, revelando similaridade com a sequência depositada (Fig: 11).

```
>gb|S82286.1| Tityus serrulatus toxin IV-5 gene, partial cds
Length=659

Score = 355 bits (192), Expect = 4e-95
Identities = 192/192 (100%), Gaps = 0/192 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAGAAAGACGGATACCCGGTGGAATACGATAACTGCGCCTACATTTGCTGGAACACGAC 60
      |||
Sbjct 387 AAGAAAGACGGATACCCGGTGGAATACGATAACTGCGCCTACATTTGCTGGAACACGAC 446

Query 61 AACGCTTACTGCGATAAGCTGTGCAAAGACAAGAAAGCCGATAGCGGATATTGTTACTGG 120
      |||
Sbjct 447 AACGCTTACTGCGATAAGCTGTGCAAAGACAAGAAAGCCGATAGCGGATATTGTTACTGG 506

Query 121 GTTCACATCCTGTGCTACTGCTACGGGCTTCCCGATAGCGAACCAGACCAAGACCAACGGA 180
      |||
Sbjct 507 GTTCACATCCTGTGCTACTGCTACGGGCTTCCCGATAGCGAACCAGACCAAGACCAACGGA 566

Query 181 AAATGCAAAATCC 192
      |||
Sbjct 567 AAATGCAAAATCC 578
```

Figura 11: Alinhamento da Ts3 clonada no vetor pCR/Ts3 pelo Blastn.

Alinhamento obtido pela análise da sequência nucleotídica da Ts3 clonada no vetor pCR 2.1 TOPO no GenBank. Apenas a sequência da ORF da Ts3 madura clonada no vetor foi submetida ao alinhamento no banco de dados.

7.4 Digestão do vetor pCR/Ts3 e dos vetores pET-26b e pET-32c

Após o Sequenciamento, foi realizada a reação de corte dos vetores pCR/Ts3, pET-26b e pET-32c com as endonucleases Nco I e Xho I para a ligação do inserto aos vetores de expressão. Depois da reação de corte as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualização da liberação do inserto Ts3 e linearização dos vetores de expressão.

A reação de corte do vetor pCR/Ts3 apresentou a liberação do inserto correspondente a Ts3 com tamanho aparente de 200 pb. O vetor pCR 2.1 TOPO apresenta um sítio para a endonuclease de restrição Nco I e um para Xho I. O sítio para a endonuclease Xho I se encontra próximo ao local de clonagem a 40 pb da posição de inserção do produto de PCR. O sítio para Nco I esta localizado a 1584 pb da posição de inserção dos produtos de PCR, dessa maneira, o vetor digerido com estas enzimas apresenta duas bandas de alto peso correspondentes aos dois cortes. No caso do vetor pCR/Ts3 são visualizadas três bandas, duas correspondentes ao vetor e a banda de baixo peso a Ts3 (Fig. 12). Mesmo com alta eficiência de corte, foi possível observar alguns plasmídeos que não foram cortados devidamente, apresentando bandas na altura do vetor não digerido.

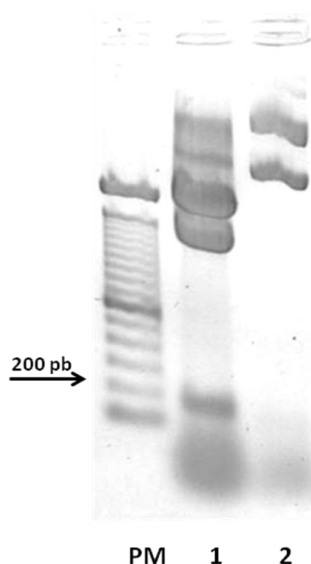


Figura 12: Digestão com as endonucleases de restrição NcoI e XhoI do vetor pCR/Ts3.

Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando a liberação do fragmento correspondente a ORF da Ts3 após a digestão do vetor pCR 2.1 TOPO com a ORF da Ts3. (PM), padrão de peso molecular; (1), vetor pCR2.1 TOPO digerido pelas endonucleases. Note a digestão parcial do vetor e a digestão de outro sítio de NcoI presente no vetor que não interfere na liberação do inseto; (2), vetor pCR /Ts3 não digerido. A seta indica o peso molecular de 200 pb.

Já os vetores de expressão pET-26b e pET-32c, apresentam apenas um sítio de reconhecimento para estas enzimas no MSC do vetor, dessa maneira ao serem digeridos pelas endonucleases liberam um pequeno fragmento não visualizado em gel de agarose (Fig. 13).

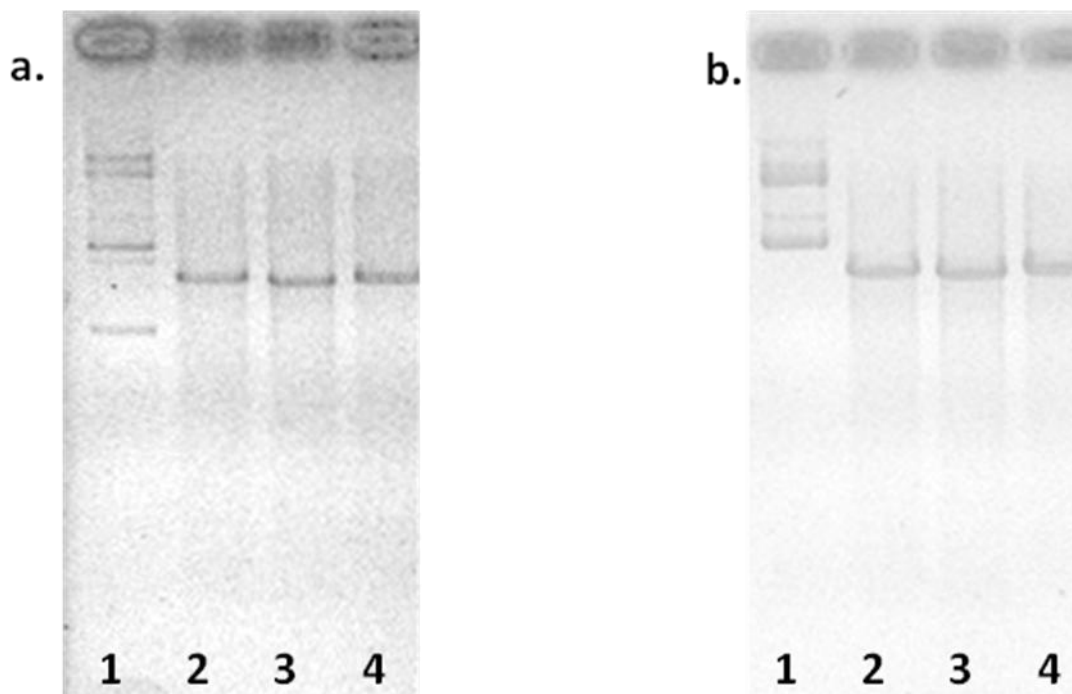


Figura 13: Digestão com endonucleases de restrição dos vetores pET-26b e pET-32c.

Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio apresentando a digestão enzimática dos vetores de expressão pelas endonucleases NcoI e XhoI. Em (a), pET26b; em (b), pET32c. A ordem da aplicação em ambos os géis é igual de maneira que em (1) temos o vetor não digerido, (2) vetor digerido com NcoI, (3) vetor digerido com XhoI e (4) Vetor digerido por NcoI e XhoI.

7.5 Purificação da banda correspondente a ORF da Ts3 e vetores de expressão em gel de agarose

Após a eletroforese em gel de 1,5% de agarose realizou a purificação dos fragmentos correspondentes a ORF da Ts3 e aos vetores linearizados. Ao lado de cada vetor cortado, foi aplicado no gel o vetor não digerido como parâmetro para a qualidade do corte.

A digestão do vetor pCR/Ts3 apresentou a liberação do inserto com tamanho de 200 pb, o vetor se mostrou com uma banda única bem forte com peso molecular diferindo das bandas do vetor não linearizado.

Após a purificação, o inserto e os vetores foram quantificados para a reação de ligação.

7.6 Clonagem da *ORF* da Ts3 nos vetores de expressão

7.6.1 pET-26b

Após a purificação das bandas referentes à *ORF* da Ts3 e dos vetores linearizados pelas endonucleases Nco I e Xho I foi realizada a reação de ligação seguida de eletrotransformação em *E. coli* XL1 blue, aproximadamente 50 colônias foram recuperadas em meio seletivo e em seguida analisadas por PCR de colônia em grupos de 10 clones (Fig. 14).

Os clones 2, 4, 7 e 10 foram selecionados para a extração plasmidial por lise alcalina e para o sequenciamento e confirmação da clonagem da Ts3 no vetor pET-26b.

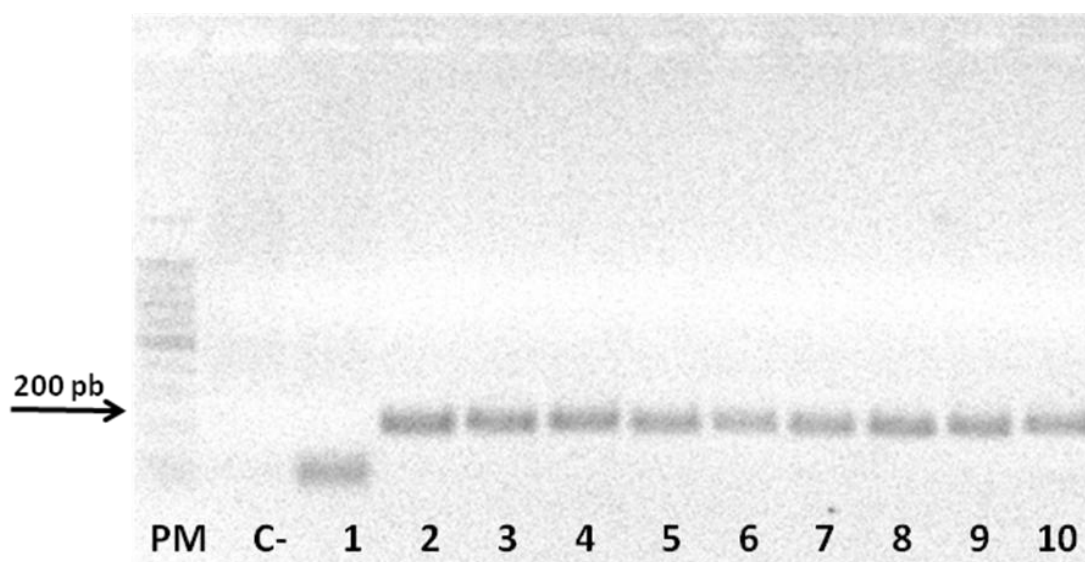


Figura 14: PCR de colônia dos clones obtidos após transformação da ligação pET26/Ts3.

Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio apresentando o produto de PCR de colônia dos clones obtidos pela transformação do produto de ligação entre Ts3 e pET26b. (PM), padrão de peso molecular; (C-) controle negativo; (C+) controle positivo com o vetor pCR/Ts3; (1 a 10), clones selecionados para a PCR de colônia. Seta indica o peso molecular de 200 pb.

7.6.2 pET-32c

Feita a purificação das bandas referentes à *ORF* da Ts3 e dos vetores linearizados pelas endonucleases Nco I e Xho I, foi realizada a reação de ligação seguida de eletrotransformação em *E. coli* XL1 blue, aproximadamente 50 colônias foram recuperadas em meio seletivo e em seguida analisadas por PCR em grupos de 10 clones (Fig. 15).

Os clones 1, 9 e 10 apresentaram amplificação satisfatória e produto de PCR com tamanho aproximado de 200 pb referente ao tamanho da *ORF* da Ts3. Estes clones foram selecionados para Sequenciamento e confirmação da clonagem da Ts3 no vetor pET32c.

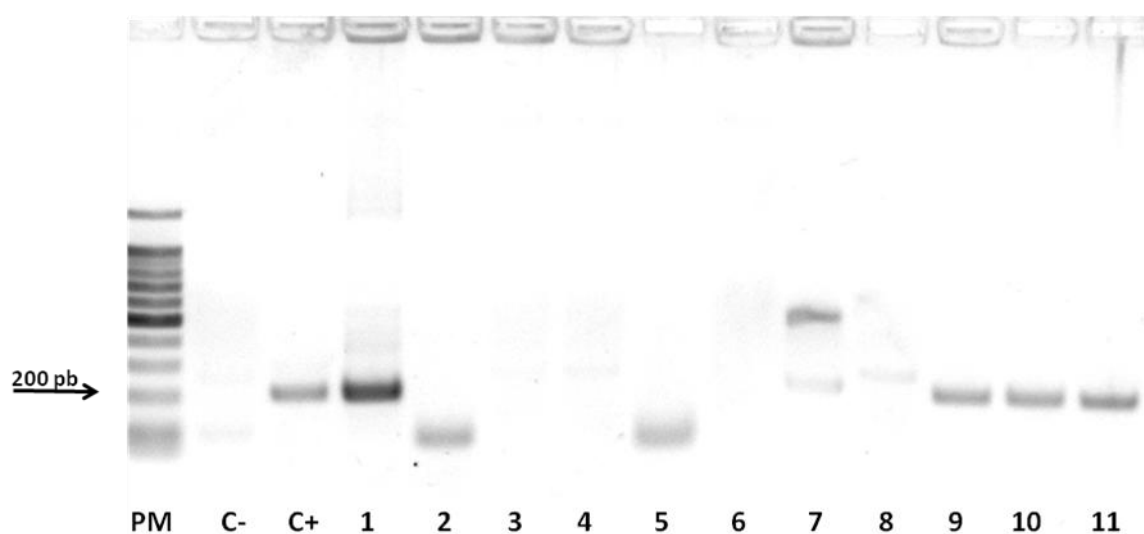


Figura 15: PCR de colônia dos clones obtidos após transformação da ligação pET32/Ts3

Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio apresentando o produto de PCR de colônia dos clones obtidos pela transformação do produto de ligação entre Ts3 e pET32c. (PM), padrão de peso molecular; (C-), controle negativo; (C+) controle positivo com o vetor pCR/Ts3; (1-10), clones selecionados para a PCR de colônia. Seta indica o peso molecular de 200 pb.

7.7 Sequenciamento dos clones de Ts3 nos vetores de expressão

A partir do resultado do sequenciamento provindo do sequenciador automático ABI 3130, observou-se a integridade das sequências e a correta ligação do vetor ao inserto. As sequências obtidas foram traduzidas pelo programa *translate* disponível no servidor “*ExPASy Proteomics Tools*” e estão em correta fase de leitura necessária para a expressão em ambos os vetores pET 26b (Fig. 16) e pET 32c (Fig. 17). Estando assim prontas para serem transformados nas linhagens de expressão de *E. coli* competentes. Os vetores de expressão, assim como seus produtos de expressão serão denominados de pET26/Ts3 ou pET32/Ts3 para facilitação da interpretação dos resultados.

Figura 26: Resultado do sequenciamento do vetor pET26/Ts3.
 Figura apresentando o resultado do sequenciamento do vetor pET26/Ts3 traduzido a partir do códon inicial após o promotor T7 pelo programa on line *Translate* disponível no servidor “Expsy Proteomics Tools”. Sublinhado e negrito a sequência da Ts3, sublinhado a cauda de histidina, o *pelB leader* esta antecessor a ORF da Ts3 e não foi destacado na figura.

CACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCT
 GCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGG
 TGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCC
 GGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA
 GCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT **ATG AGC**
M S

GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA
 D K I I H L T D D S F D T D V L K

GCG GAC GGG GCG ATC CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC
 A D G A I L V D F W A E W C G P C

AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA
 K M I A P I L D E I A D E Y Q G K

CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC CCT GGC ACT GCG CCG AAA
 L T V A K L N I D Q N P G T A P K

GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC
 A A T K V G A L S K G Q L K E F L

GAC GCT AAC CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT
 D A N L A G S G S G H M H H H H H

CAT TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT
H S S G L V P R G S G M K E T A A

GCT AAA TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC
 A K F E R Q H M D S P D L G T D D

GAC GAC AAG GCC ATG GAT AAG AAA GAC GGA TAC CCG GTG GAA TAC GAT AAC
 D D K A M D K K D G Y P V E Y D N

TGC GCC TAC ATT TGC TGG AAC TAC GAC AAC GCT TAC TGC GAT AAG CTG TGC
C A Y I C W N Y D N A Y C D K L C

AAA GAC AAG AAA GCC GAT AGC GGA TAT TGT TAC TGG GTT CAC ATC CTG TGC
K D K K A D S G Y C Y W V H I L C

TAC TGC TAC GGG CTT CCC GAT AGC GAA CCG ACC AAG ACC AAC GGA AAA TGC
Y C Y G L P D S E P T K T N G K C

AAA TCC CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCG
K S L E H H H H H H -

AAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAA
 CGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGAT

Figura 17: Resultado do sequenciamento do vetor pET32/Ts3.

Figura apresentando o resultado do sequenciamento do vetor pET32/Ts3 traduzido a partir do códon inicial após o promotor T7 pelo programa *on line Translate* disponível no servidor "ExPASy Proteomics Tools". Sublinhado e negrito a sequência da Ts3, sublinhado a cauda de histidina, em negrito a cauda de Thiredoxina.

7.8 Expressão

As primeiras expressões foram realizadas juntamente com seus controles negativos (linhagem sem vetor e linhagem com vetor sem inserto), os controles foram expressos durante 16 horas a 37°, ou seja, nas condições em que há maior crescimento bacteriano. Este experimento foi repetido mais de cinco vezes nas mesmas condições. Em todas as linhagens não se observou a presença de bandas de proteínas com peso molecular próximo das bandas esperadas para a expressão da Ts3 em ambos os vetores (pET 26b e pET32c).

7.8.1 Expressão da pET26/Ts3

Após a transformação do vetor pET26/Ts3 nas células de *E. coli* Origami 2 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3) realizou um ensaio piloto para a verificação da expressão da Ts3 recombinante.

Dentre as condições testadas para cada linhagem, a que apresentou maior rendimento de expressão e solubilidade foi selecionado para a expressão em maior escala.

A linhagem Origami 2 (DE3) apresentou baixa competência, sendo obtidas poucas colônias depois da transformação. Já as linhagens C41 (DE3) e C43 (DE3) apresentaram altíssima competência, sendo necessária uma diluição da cultura antes do plaqueamento.

A linhagem Origami 2 (Fig. 18 a) apresentou bom desempenho de expressão nas diversas condições analisadas com banda referente a Ts3 heteróloga destacada das outras proteínas bacterianas. A melhor temperatura de expressão foi a de 37°C que apresentou maior quantidade de proteínas recombinantes. O tempo de expressão de 16 horas se mostrou mais eficiente na expressão por permitir o acúmulo de uma maior biomassa de células quando comparada a quatro horas de expressão, isto se deve ao crescimento lento de Origami 2 em comparação as outras linhagens utilizadas neste estudo. Outro fato muito interessante observado especificamente nesta linhagem foi a expressão obtida em ausência de indutor (fato não investigado nesta dissertação). Em todas as variáveis analisadas para a expressão, a linhagem Origami expressou a Ts3 recombinante na ausência do indutor IPTG, o que se torna uma vantagem econômica na expressão utilizando esta linhagem. Nas expressões durante 4 horas é observado um pequeno acúmulo de Ts3 nas culturas induzidas com IPTG, isso pode se dever a expressão antecedente à indução, que manteve uma quantidade de Ts3 que não foi degradada pela Origami posteriormente.

A linhagem C41 (DE3) apresentou o menor potencial de expressão quando comparada a outras linhagens (Fig. 18 b). Foi observada a expressão em todas as condições testadas, sendo que a melhor condição de expressão para esta linhagem com a

construção pET26/Ts3 foi a 37°C por 4 horas. A banda correspondente a Ts3 foi observada apenas nas culturas induzidas por IPTG.

A linhagem C43 (DE3) apresentou a maior quantidade de expressão heteróloga quando comparada a outras linhagens (Fig. 18 c). Observou-se a expressão em todas as condições testadas com a maior expressão a 25°C por 16 horas, não foi observada a expressão em ausência do indutor IPTG.

Devido aos resultados apresentados e características da própria linhagem, como a capacidade de expressão em ausência de IPTG e a capacidade de facilitar a formação de pontes dissulfeto a linhagem Origami 2 (DE3) foi selecionada para os próximos ensaios de expressão em maior escala.

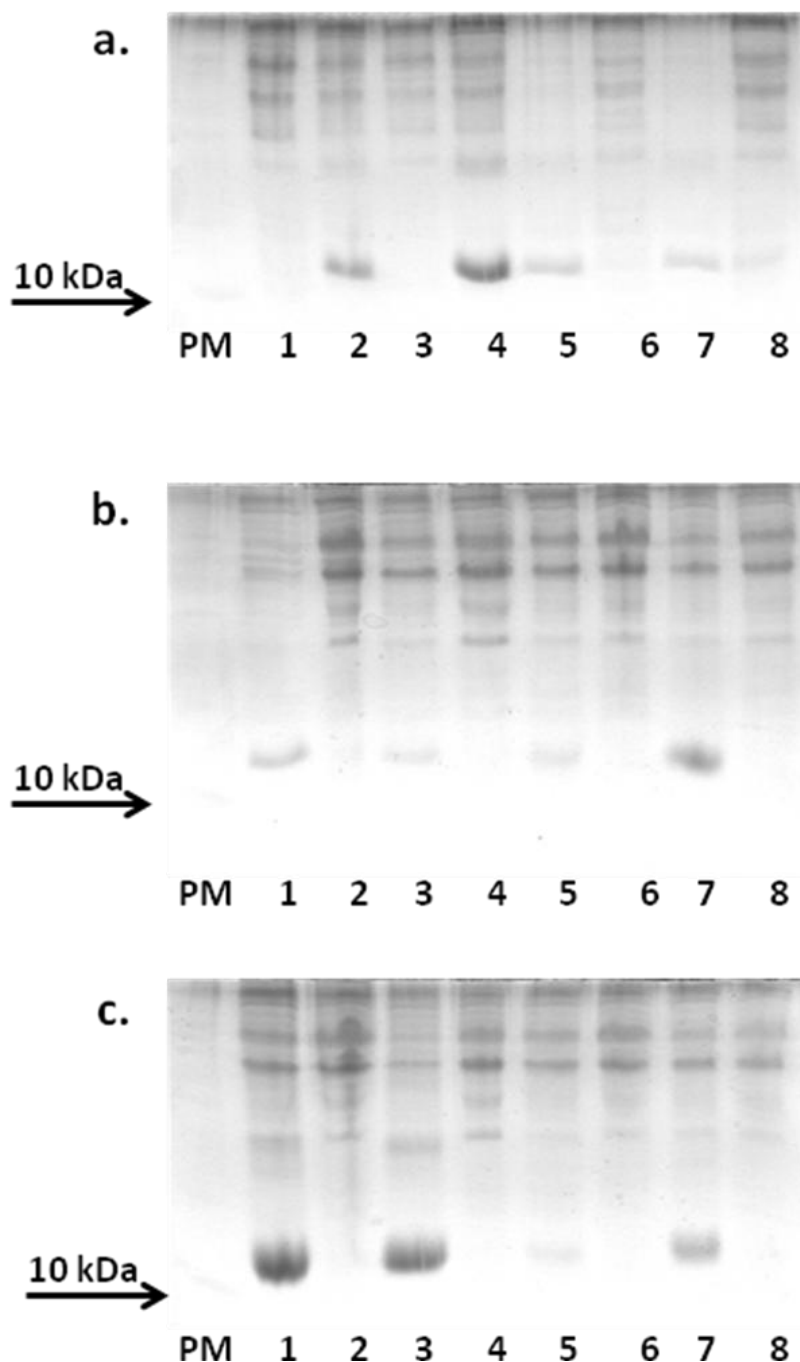


Figura 18: Teste de melhores condições de expressão da pET26/Ts3.

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com os testes de expressão das três linhagens selecionadas com variação no tempo de expressão, na temperatura e indução com IPTG. Em (a) Origami; (b) C41 e (c) C43. (PM), marcador de peso molecular; Números ímpares, indução com IPTG; números pares, não indução com IPTG. (1-2) 16 horas, 25 °C; (3-4), 16 horas, 37 °C; (5-6), 4 horas 25 °C; (7-8) 4 horas 37 °C. A banda correspondente a Ts3 possui aproximadamente 11 kDa e se apresenta como a mais forte em todas as variáveis.

Em todas as linhagens analisadas não foi notado o transporte da Ts3 recombinante ao periplasma bacteriano, isso pode se dever a formação de corpos de inclusão no citoplasma da bactéria, que impede o transporte da proteína recombinante para o periplasma (Fig. 19). Além disso, foi detectada a ausência da clivagem do *pelB leader* pela protease endógena devido a incapacidade de transporte, uma vez que as enzimas necessárias a este corte se localizam no periplasma, fazendo com que a fusão entre Ts3/*pelB leader* apresente o tamanho de aproximadamente 11 kDa.

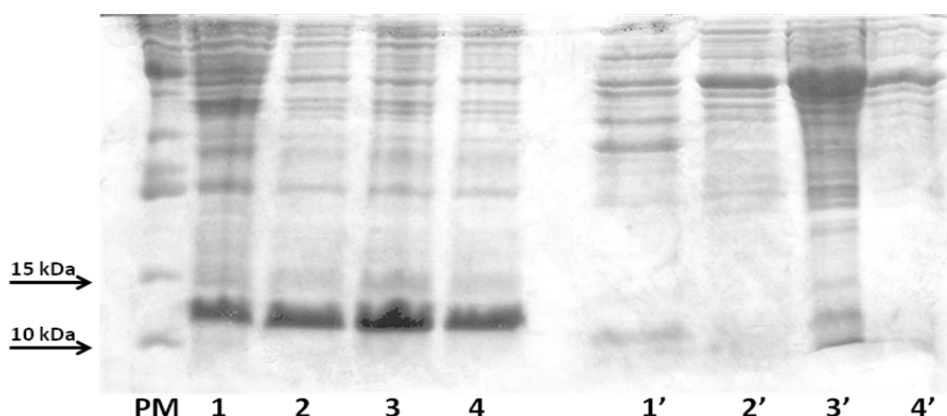


Figura 19: Expressão de 4 colônias de Origami pET26/Ts3 em ausência de IPTG.

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com os testes de exportação periplasmática da Ts3. (PM), padrão de peso molecular; (1 - 4), amostra total de proteínas bacterianas; (1' - 4'), amostra protéica obtida pela lise de choque osmótico evidenciando as proteínas presentes no espaço periplasmático. Note que a banda correspondente a Ts3 não aparece na lise de choque osmótico, indicando que a Ts3 não foi exportada ao periplasma bacteriano.

7.8.2 Expressão da pET32/Ts3

De maneira semelhante à expressão da Ts3 em pET26b, o vetor pET-32c apresentou alto rendimento de Ts3 recombinante nas três linhagens analisadas. As três linhagens demonstraram a mesma capacidade de expressão quando comparadas entre si, contudo, a expressão utilizando o vetor pET-32c apresentou maiores níveis de expressão quando comparado ao pET-26b (Fig. 20). Este fato pode se dever a expressão da proteína de fusão maior (cerca de 18 kDa) que pode estabilizar a expressão da Ts3 de maneira a se obter uma alta quantidade final de proteínas recombinantes. Em contraste com a grande quantidade de proteínas recombinantes produzidas, temos o fato da presença de uma maior proteína de fusão (a cauda de Trx), o que diminui a quantidade de Ts3 especificamente, já que ela representa aproximadamente 30% do tamanho total do produto de fusão.

Devido aos resultados apresentados e características da própria linhagem, como formação de pontes dissulfeto no espaço periplasmático e ausência de indução por IPTG, a linhagem Origami 2 (DE3) foi selecionada para os próximos ensaios de expressão em maior escala.

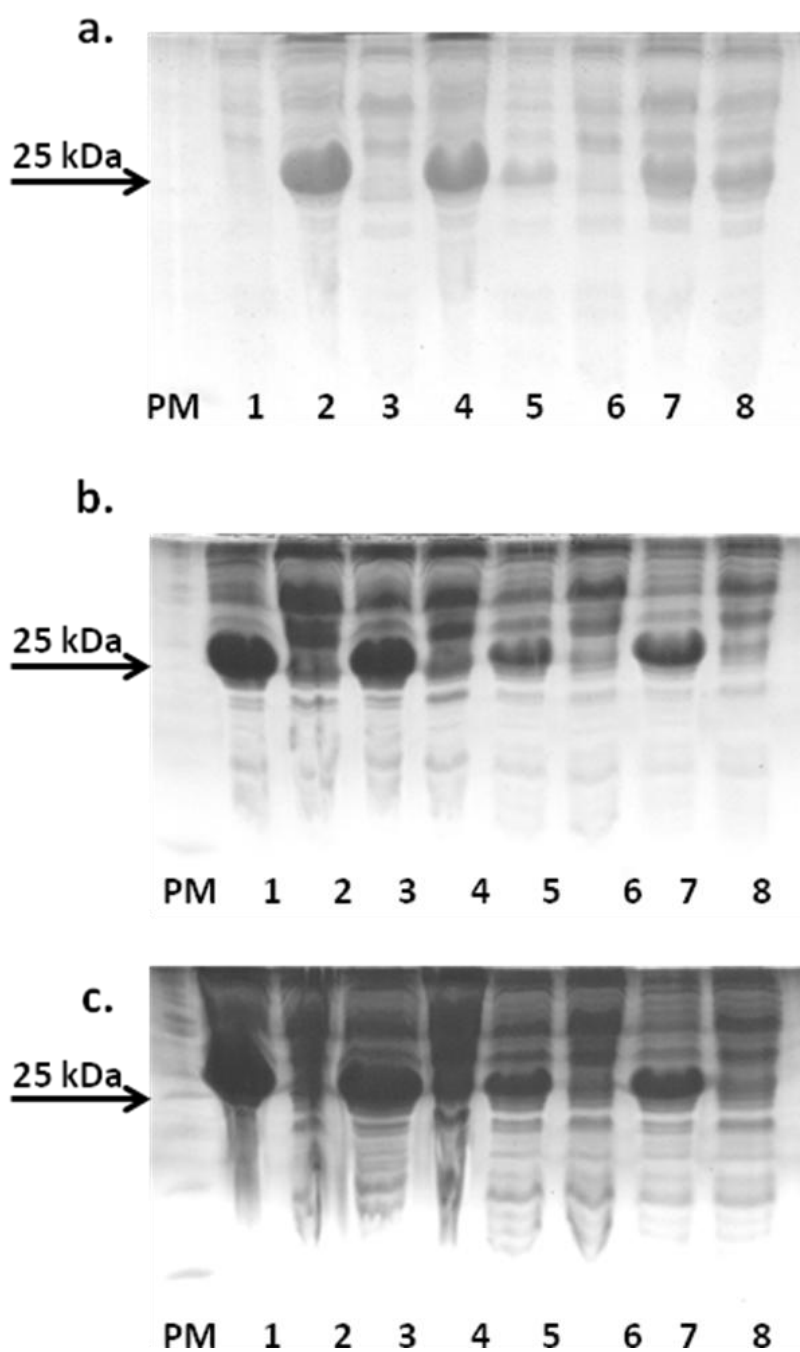


Figura 20: Teste das melhores condições de expressão da pET32/Ts3.

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com os testes de expressão das três linhagens selecionadas com variação no tempo de expressão, na temperatura e indução por IPTG. Em (a) Origami; (b) C41 e (c) C43. (PM), marcador de peso molecular; Números ímpares, indução com IPTG; números pares, não indução com IPTG. (1-2) 16 horas, 25 °C; (3-4), 16 horas, 37 °C; (5-6), 4 horas 25 °C; (7-8) 4 horas 37 °C. A banda correspondente a proteína de fusão Ts3 e Trx possui aproximadamente 25 kDa e se apresenta como a mais forte em todas as variáveis.

7.9 Solubilidade da Ts3 recombinante

Dentre as condições de expressão utilizadas para a construção pET26/Ts3, as expressões com duração de 16 horas obtiveram melhor rendimento da Ts3 recombinante. Desta maneira a solubilidade da pET26/Ts3 foi testada com expressões de 16 horas com temperaturas de 25°C e 37°C. A linhagem Origami não recebeu indução por IPTG, todavia as linhagens C41 e C43 receberam (Fig. 21). As bactérias foram lisadas como descrito anteriormente.

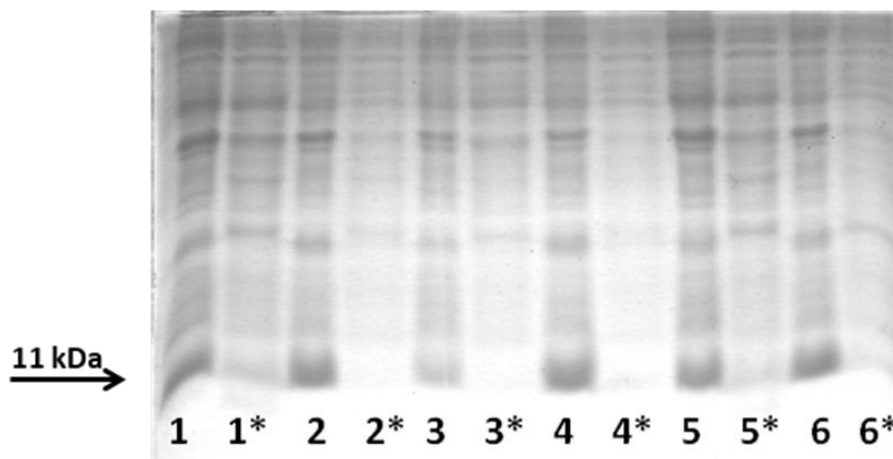


Figura 21: Ensaio de solubilidade da pET26/Ts3.

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com as amostras solúveis e insolúveis resultantes da expressão de pET26/Ts3 por 16 horas e variação de temperatura entre 25 °C ou 37°C. As amostras (*) se referem à fase solúvel. (1), Origami a 25°C; (2), Origami a 37°C; (3), C41 a 25°C; (4), C41 a 37°C; (5), C43 a 25°C; (6), C43 a 37°C. Note a baixa solubilidade da Ts3 recombinante.

Dentre as linhagens analisadas a linhagem Origami apresentou maior solubilidade da pET26/Ts3 quando expressa a 25°C dentre todas as linhagens e condições testadas. Origami foi a linhagem que apresentou maior quantidade de pET26/Ts3 solúvel, mas a maior parte da TS3 recombinante se encontra insolúvel.

Para a construção pET32/Ts3, as expressões obtiveram resultados semelhantes às expressões em pET26/Ts3 (Fig. 22), inclusive na capacidade de solubilidade das amostras expressas.

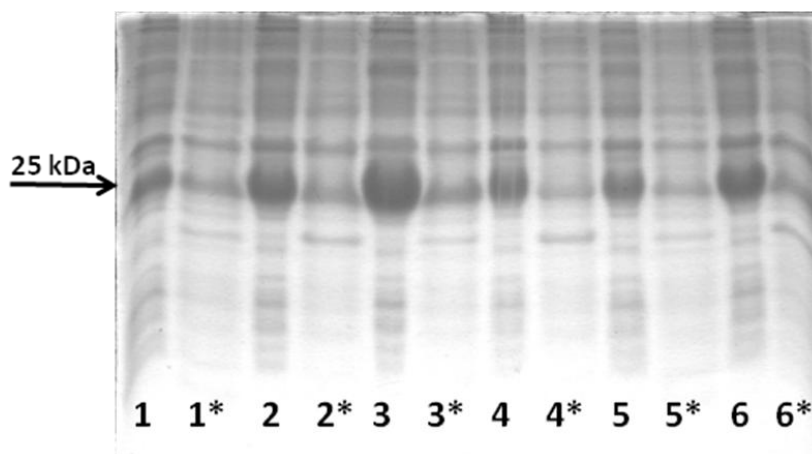


Figura 22: Ensaio de solubilidade da pET32/Ts3.

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com as amostras solúveis e insolúveis resultantes da expressão de pET32/Ts3 por 16 horas e variação de temperatura entre 25 °C ou 37°C. . As amostras (*) se referem à fase solúvel. (1), Origami a 25°C; (2), Origami a 37°C; (3), C41 a 25°C; (4), C41 a 37°C; (5), C43 a 25°C; (6), C43 a 37°C. Note a maior solubilidade da Ts3 recombinante nesta construção em relação a pET26/Ts3.

7.10 Purificação da Ts3 recombinante

7.10.1 pET26/Ts3

Origami foi a linhagem com melhor rendimento de solubilidade da pET26/Ts3 e foi escolhida para as expressões em larga escala. A fração solúvel incubada com a resina de Ni-NTA foi purificada como descrito. Devido à cauda de histidina obteve-se rendimento razoável em sua purificação (Fig. 23). Em média cada litro de cultura expressa por 16 horas a 25°C foi obtida cerca de 20 mg de pET26/Ts3 semi-purificada e quantificada pelo método de Bradord.

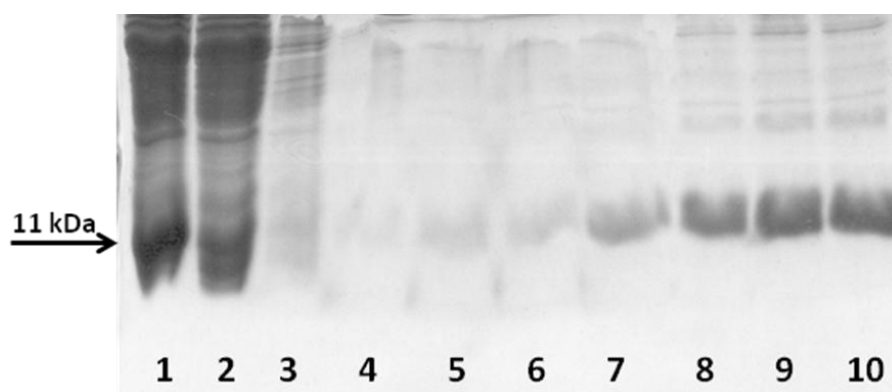


Figura 23: Purificação em condição não desnaturante da pET26/Ts3 expressa em Origami.

Resolução eletroforética em gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE da purificação da pET26/Ts3 expressa em Origami. (1), amostra solúvel da expressão de pET26/Ts3 em Origami a 25°C por 16 horas; (2), amostra que não se ligou a coluna; (3), lavagem; (4-10), eluições da pET26/Ts3. A seta indica o peso molecular de 11 kDa. Note a presença da pET26/Ts3 mais concentrada nas linhas 8-10.

7.10.2 pET32/Ts3

Como a linhagem Origami apresentou a maior solubilidade do que pET32/Ts3 ela foi selecionada para as expressões em larga escala de purificação da pET32/Ts3. A fração solúvel da expressão da pET32/Ts3 foi ligada na coluna de Ni-NTA para a purificação da Ts3. Devido à presença de duas caudas com seis histidinas cada, a purificação desta construção apresentou alto nível do rendimento da recuperação da Ts3 recombinante (Fig. 24). Dessa maneira pode-se diminuir a quantidade de cultura utilizada para a obtenção de Ts3 nesta construção. Em média cada expressão de 500 mL de cultura rendeu 50 mg de Ts3 semi-purificada quantificada pelo método de Bradford.

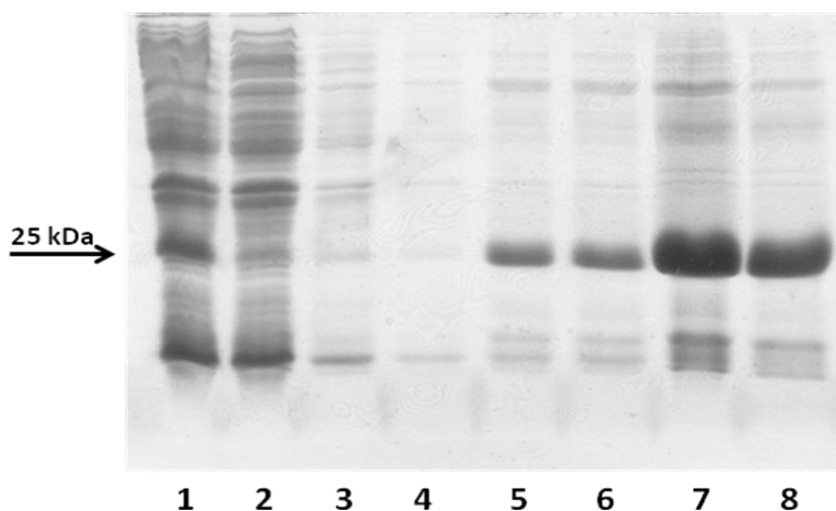


Figura 24: Purificação em condição não desnaturante da pET32/Ts3 expressa em Origami.

Resolução eletroforética em gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE da purificação da pET32/Ts3 expressa em Origami. (1), amostra solúvel da expressão de pET32/Ts3 em Origami a 25°C por 16 horas; (2), amostra que não se ligou a coluna; (3), lavagem; (4-8) eluições da Ts3/Trx. Seta indica o peso molecular de 25 kDa. Note a forte banda da pET32/Ts3 apresentada na linha 7, exibindo alto rendimento de purificação.

7.11 Corte com enteroquinase

Após a purificação da pET32/Ts3 em condições nativas foi realizada uma diálise com o tampão ótimo para ação da enteroquinase (COLLINS-RACIE, *et. al.*, 1995). Depois da digestão as amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 18%. A enteroquinase apresentou digestão parcial da pET32/Ts3 evidenciada pela presença da banda da fusão entre Ts3 e a cauda de tiorredoxina a 25 kDa (Fig. 25). Um problema enfrentado neste corte é a dificuldade de separação da Ts3 de seu peptídeo de fusão. Foram realizadas tentativas de purificação por filtração com membranas de poros de 10 e 30 kDa mas sem sucesso.

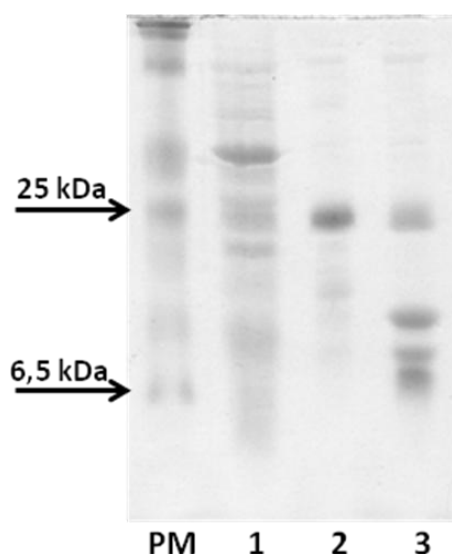


Figura 25: SDS-PAGE do corte da pET32/Ts3 com Enterokinase.

Resolução eletroforética em gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com o resultado da digestão da Ts3 fusionada a cauda de Trx. (PM), Padrão de peso molecular; (1), amostra solúvel da expressão de pET32/Ts3 em Origami; (2), pET32/Ts3 purificada em coluna de níquel; (3), digestão da fusão entre Ts3 e tiorredoxina pela enteroquinase liberando a Ts3 com peso molecular de 8 kDa, e a cauda de tiorredoxina com peso de 18 kDa.

7.12 Titulação dos soros

Os soros obtidos foram titulados em placas de ELISA com diluições de 1:500 a 1:64.000 usando 5 µg/mL de substrato. Os substratos utilizados neste trabalho foram veneno bruto de *T. serrulatus* ou pET26/Ts3. Este experimento foi repetido por três vezes em duplicata.

7.12.1 Soro anti-pET26/Ts3

Uma placa de ELISA sensibilizada com 5 µg/mL de pET26/Ts3 foi utilizada para a titulação do soro anti-pET26/Ts3. Amostras em duplicata de cada soro do 3^a a 7^a doses foram testadas em diluições seriadas iniciando em 1:500 a 1:64.000, bem como o soro pré-imune. Este experimento foi repetido por três vezes. Serão apresentados os valores do 5^a a 7^a doses, como controle negativo utilizou-se o extrato solúvel da expressão de Origami 2 (DE3) com o vetor pET-26b sem inserto, frente a cada soro imune. Os valores do controle negativo foram deduzidos dos valores das amostras em cada diluição.

É notado um aumento do reconhecimento dos soros ao passar o número de doses, de maneira que o soro coletado após a 6^o dose apresenta maior reconhecimento do que o soro referente a 5^a dose (Fig. 26).

A última imunização utilizando 150 µg de veneno bruto de *T. serrulatus* (7ª dose) apresentou resultados muito semelhantes a 6ª dose utilizando-se 150 µg de pET26/Ts3, indicando que esta dose não contribuiu de maneira significativa para o aumento do reconhecimento do soro anti-pET26/Ts3 frente a Ts3 recombinante.

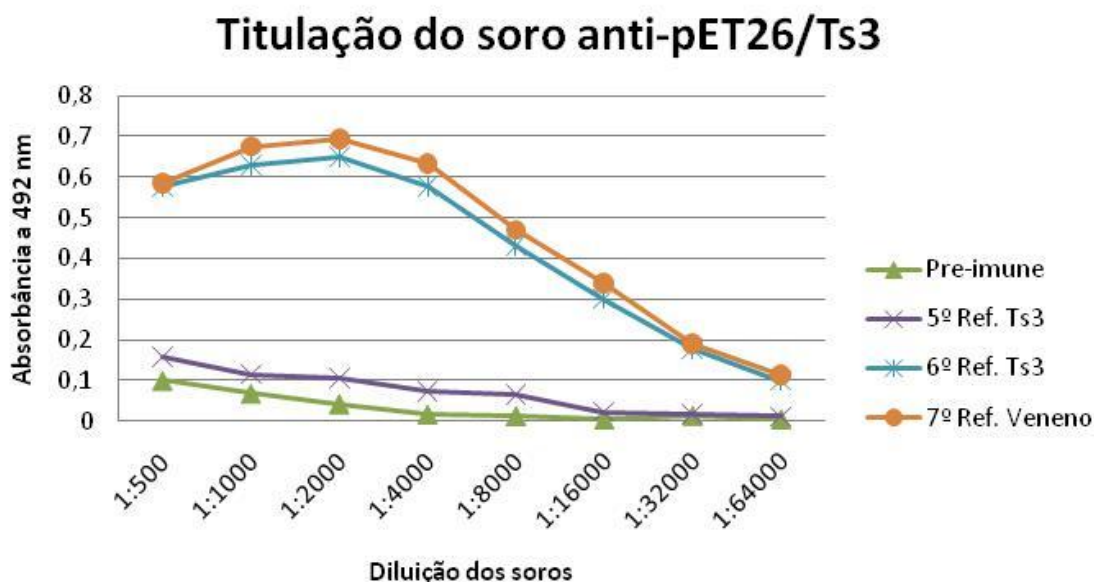


Figura 26: Titulação do soro anti-pET26/Ts3.

Placa de ELISA sensibilizada com pET26/Ts3 recombinante a 5 µg/mL de tampão carbonato. Foram utilizados o soro pré-imune do coelho e os soros imunes com as 5ª, 6ª e 7ª dose com 150 µg de pET26/Ts3. A 7ª dose foi realizada com veneno bruto de *T. serrulatus*. Os valores apresentados foram deduzidos da fração solúvel da expressão de Origami com o vetor pET26b sem inserto utilizado como controle negativo.

7.12.2 Soro anti-veneno bruto de *T. serrulatus*

Uma placa de ELISA sensibilizada com 5 µg/mL de veneno bruto de *T. serrulatus* foi utilizada para a titulação do soro anti-veneno bruto. Amostras em duplicata de cada soro da 3ª a 5ª doses foram testadas em diluições seriadas iniciando em 1:500 a 1:64.000, bem como o soro pré-imune, este experimento foi repetido por 3 vezes. Como controle negativo, foi utilizado o soro pré-imune frente ao substrato de veneno bruto, os valores do soro pré-imune foram deduzidos dos valores encontrados pelos soros imunes em cada diluição.

O reconhecimento do soro foi satisfatório para todas as diluições apresentadas mostrando pouco acréscimo de reconhecimento entre os intervalos de imunização, dessa maneira não foram realizados mais doses reforço para imunização (Fig. 27).

Titulação do soro anti-veneno bruto

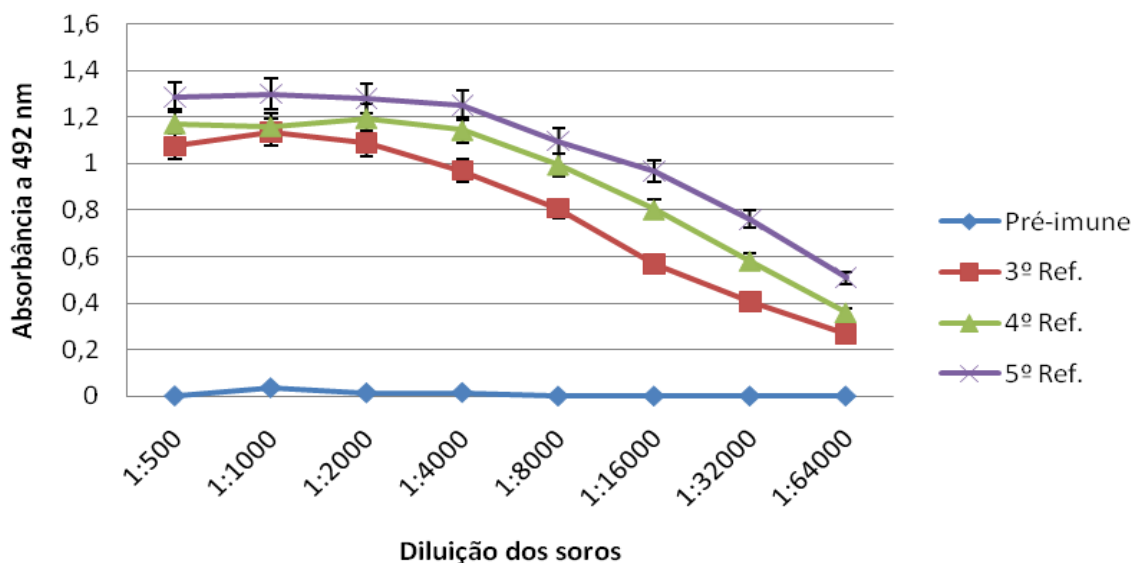


Figura 27: Titulação do soro anti-veneno bruto de *T. serrulatus*.

Placa de ELISA sensibilizada com veneno bruto de *T. serrulatus* a 5 µg/mL de tampão carbonato. Foram utilizados o soro pré-imune do coelho e os soros imunes referentes as 3ª, 4ª e 5ª doses de veneno bruto. Os valores apresentados foram deduzidos do valor do soro pré-imune utilizado como controle negativo.

7.13 ELISA

Uma placa de ELISA sensibilizada com pET26/Ts3, Ts3/pET32, Ts3 nativa e veneno bruto de *T. serrulatus* foi incubada com os soros anti-pET26/Ts3, anti-pET26/Ts3 + veneno e anti-veneno bruto para avaliação do reconhecimento destes antígenos (Fig. 28).

Os soros anti-pET26/Ts3 e anti-pET26/Ts3 + veneno obtiveram bom reconhecimento da Ts3 recombinante em ambas as construções, sendo que o reconhecimento maior foi notado contra a pET26/Ts3. Entretanto, o soro anti-veneno obteve maior reconhecimento nestes substratos.

Já a Ts3 nativa e veneno bruto obtiveram baixos níveis de reconhecimento frente o soro anti-pET26/Ts3, em contrapartida o soro anti-pET26/Ts3 + veneno obteve um aumento de aproximadamente 70% no valor de reconhecimento com apenas uma dose de veneno bruto em relação ao veneno bruto e de 80% em relação a Ts3 nativa. Indicando que uma prévia imunização com a pET26/Ts3 foi capaz de preparar o coelho para receber uma dose de 150 µg de veneno e produzir um reconhecimento de ELISA alto, em relação a uma mesma dose sem prévia imunização.

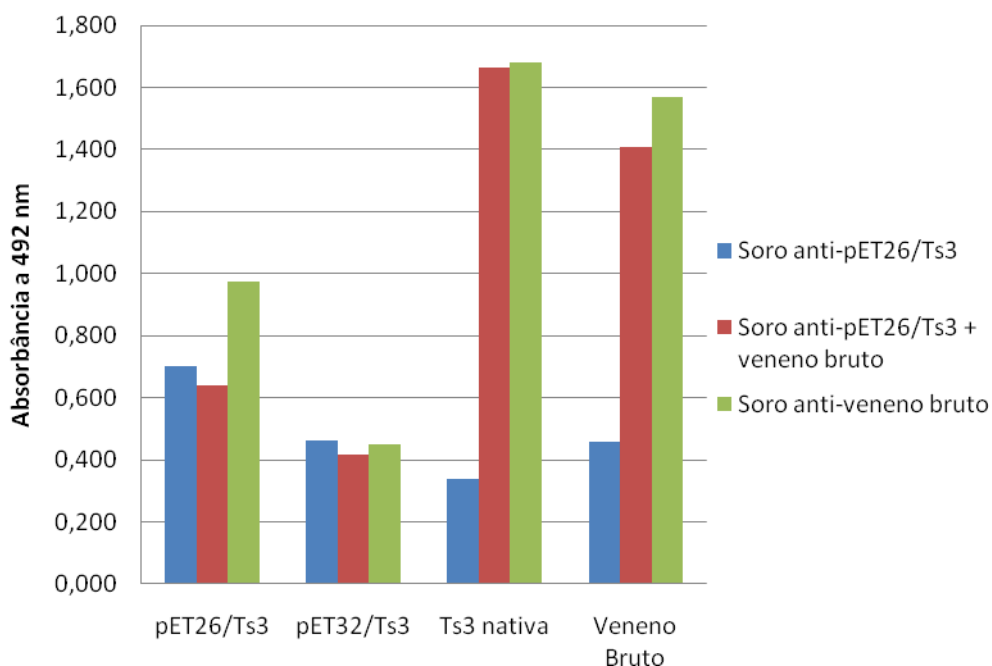


Figura 28: Elisa com Ts3 recombinante, Ts3 nativa e veneno bruto.

Placa de ELISA sensibilizada com 5 µg/mL de antígeno pET26/Ts3, pET32/Ts3, Ts3 nativa e veneno bruto de *T. serrulatus*. Foram utilizados os soros imunes anti-pET26/Ts3, anti-pET26/Ts3 + veneno e anti-veneno bruto na diluição de 1:500. Note o aumento de reconhecimento por ELISA com apenas uma dose de veneno bruto no coelho previamente imunizado com pET26/Ts3. Os valores apresentados foram deduzidos da fração solúvel da expressão de Origami com o vetor pET26b sem inserto e do valor do soro pré-imune.

7.14 Western Blot

Foi preparado um gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE com 10 µg do extrato total de proteínas bacterianas após a expressão da pET26/Ts3 e pET32/Ts3, foi usado como controle 10 µg de veneno bruto de *T. serrulatus* e 10 µg do extrato bacteriano de Origami portando o vetor pET26b sem inserto.

Após resolução eletroforética as proteínas foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose e reveladas com soro anti-veneno de *T. serrulatus* produzido em coelhos.

Houve bom reconhecimento do veneno transferido a membrana pelo soro como era esperado (Fig. 29). Ambas as construções de Ts3 recombinante foram reconhecidas pelo soro usado, mas houveram outras bandas protéicas reconhecidas por este soro. Isso se deve pelo fato de ter sido usado o soro total de coelho, sem prévia purificação dos anticorpos específicos ao veneno de *T. serrulatus*, desta maneira o soro contém anticorpos anti-proteínas bacterianas, uma vez que o adjuvante de Freund's também possui proteínas bacterianas.

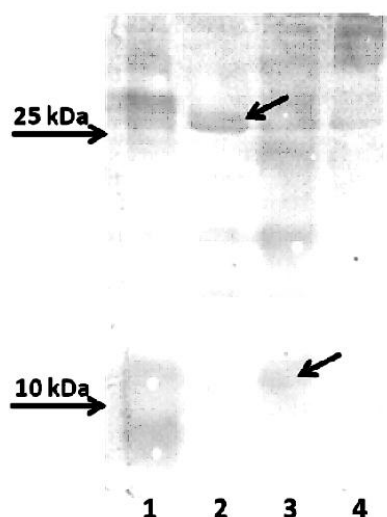


Figura 29: Western Blot com o extrato protéico bacteriano da expressão da Ts3.

Membrana de nitrocelulose incubada com soro anti veneno bruto de *T. serrulatus*. Setas na lateral esquerda indicam o peso molecular. Setas oblíquas indicam as bandas referentes as toxinas recombinantes. 1, veneno bruto de *T. serrulatus*; 2, extrato protéico bacteriano da expressão de pET32/Ts3; 3, extrato protéico da expressão da pET26/Ts3; 4, extrato protéico da linhagem Origami utilizada nas expressões de ambas construções.

7.15 Determinação da DL₅₀

O veneno utilizado neste estudo foi recém extraído. As doses e mortes estão descritas na tabela 10. A dose letal para 50% da população foi determinada com o auxílio do programa StatPlus em 3,29 µg com erro padrão de 0,694 para camundongos de peso médio de 20 g (18-22 g) pelo método de Probitos. Foram utilizados em cada grupo seis animais. O programa StatPlus esta disponível para download em: <http://www.analystsoft.com/en/products/statplus/download.phtml>.

Tabela 10: Determinação da DL₅₀ para o veneno bruto de *T. serrulatus*

Grupos	Dose de Veneno Fator 1.3	Mortes após 24 horas
Controle	-	0/6
1	2,50	2/6
2	3,25	2/6
3	4,23	6/6
4	5,49	6/6
5	7,14	6/6

7.16 Teste de Toxicidade da Ts3 recombinante

Visto que para a imunização dos coelhos com a Ts3 recombinante seria interessante que ela não possuísse nenhum efeito farmacológico, então avaliou a atividade farmacológica da Ts3 recombinante expressa em ambos os vetores em quantidades muito superiores a 20 DL₅₀ do veneno bruto. A Ts3 recombinante não apresentou atividade farmacológica em todas as variáveis analisadas conforme a tabela 11.

Tabela 11: Teste de toxicidade da Ts3 recombinante.

Grupos	Inóculo e dose	Mortes após 24 horas	Efeitos
1	Solução de eluição para purificação de proteínas em condições nativas	0/4	Nenhum efeito observado
2	pET26/Ts3 purificado	0/4	Nenhum efeito observado
3	pET32/Ts3 purificado	0/4	Nenhum efeito observado
4	pET32/Ts3 purificado cortado com Enteroquinase	0/4	Nenhum efeito observado
5	2 DL ₅₀ de veneno bruto de <i>T. serrulatus</i>	4/4	Todos os sintomas de envenenamento

7.17 Ensaios de Neutralização

Foram testados neste ensaio a capacidade de neutralização dos soros anti-pET26/Ts3 e anti-pET26/Ts3-veneno bruto. Como controles foram utilizados PBS/BSA 1%, soro pré-imune e soro anti-veneno. Os resultados de mortes se encontram na Tabela 12.

O soro anti-veneno bruto de *T. serrulatus* apresentou total proteção em ambas as doses de veneno, os animais utilizados não apresentaram sintomas de envenenamento e após a aplicação todos os camundongos demonstraram comportamento normal.

Os animais que receberam as doses de veneno bruto com soro pré-imune e PBS/BSA 1% apresentaram todos os sintomas de envenenamento como dor, agitação, prostração, salivação, sudorese lacrimação e em alguns animais foi observado sangramento bucal. Os animais que receberam 1 DL₅₀ tiveram morte após 2 horas de aplicação da mistura veneno/soro, já os animais que receberam 2 DL₅₀ tiveram morte antes de 1 hora após a aplicação.

O soro anti-pET26/Ts3 não apresentou eficácia na proteção dos animais contra o veneno bruto de *T. serrulatus*. Os camundongos que receberam 1 DL₅₀ apresentaram todos os sintomas de envenenamento descritos anteriormente e tiveram comportamento parecido com os controles. Já os animais que receberam 2 DL₅₀, além dos sintomas do

envenenamento ficaram muito agitados e agressivos, foi observado a prostração destes animais apenas próximo a sua morte.

O soro anti-pET26/Ts3 com uma dose de veneno bruto apresentou proteção contra o 1 DL₅₀ do veneno de *T. serrulatus*, os animais que receberam esta dose apresentaram sintomas moderados de envenenamento e sobreviveram por 24 horas após a aplicação. Os animais que receberam 2 DL₅₀ também tiveram os sintomas de envenenamento abrandados e os óbitos surgiram após 8 horas de aplicação, este fato pode se dever a proteção parcial contra o veneno bruto.

Tabela 12: Ensaio de neutralização com soro anti-pET26/Ts3.

Grupos	Soro	DL₅₀	Mortes após 24 horas
1	PBS/BSA 1%	1	3/4
		2	4/4
2	Pré-imune	1	2/4
		2	4/4
3	anti-pET26/Ts3	1	2/4
		2	4/4
4	anti-pET26/Ts3 + veneno bruto	1	0/4
		2	4/4
5	anti-veneno bruto de <i>T. serrulatus</i>	1	0/4
		2	0/4

7.18 SPOT

Uma membrana de SPOT contendo epítomos lineares de 15 aminoácidos com janela de 1 aminoácido de 3 toxinas e 1 proteína do veneno de *T. serrulatus* foi sensibilizado com soro anti-pET26/Ts3, soro anti-pET26/Ts3 + veneno e soro anti-veneno de *T. serrulatus*.

A reação identificou os epítomos mais reativos para os soros testados (Fig. 30) de acordo com a intensidade de coloração da membrana, quanto mais escuro o ponto, maior foi o reconhecimento deste epítomo. A quantificação foi feita com base no ponto mais reativo de cada membrana que totaliza 100 % de reconhecimento.

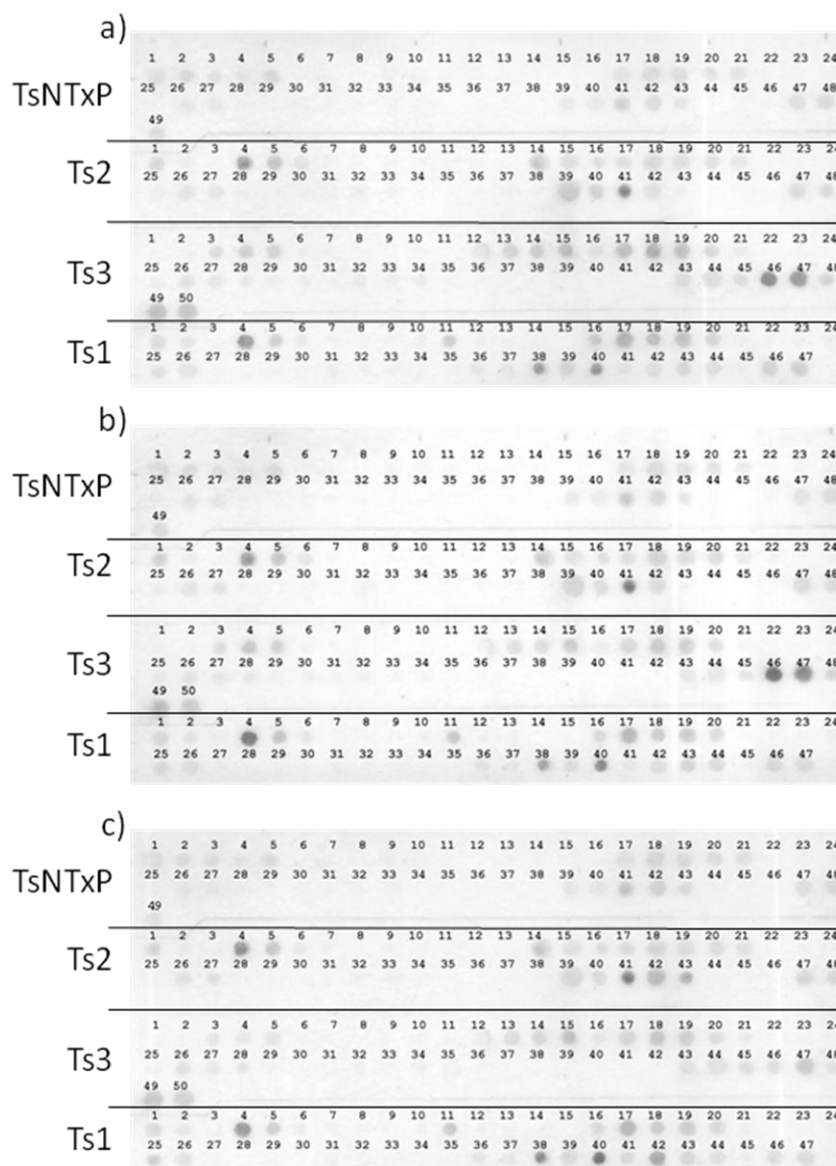


Figura 30: Membrana de SPOT com os epítomos lineares das principais toxinas de *T. serrulatus*

Membrana de celulose contendo os epítomos lineares das principais toxinas de *T. serrulatus*. Epítomos sintéticos com 15 aminoácidos e sobreposição de 1 aminoácido. Os pontos escuros foram reconhecidos pelos soros utilizados. À esquerda o nome da toxina a qual as sequencias foram geradas. a) SPOT com soro anti-pET26/Ts3; b) SPOT com soro anti-pET26/Ts3 e uma dose de veneno bruto; c) SPOT com soro anti veneno bruto de *T. serrulatus*.

Os epítomos relativos a TsNTxP apresentou baixa reatividade em relação as outras toxinas presentes na membrana. Apresentou reconhecimento nos pontos de 1-5, 17-21 e 39-43 e de 47-49 em todos os soros testados, sendo que o soro anti-veneno foi mais reconhecido, já os soros anti-pET26/Ts3 com e sem dose de veneno apresentaram reconhecimento próximos. Em todos os epítomos reativos não foi examinado mais de 50 % de intensidade de coloração (Fig. 31 a).

Os epítomos referentes à toxina Ts1 apresentaram coloração mais intensa nas porções amino-terminal e na porção carboxi-terminal e uma pequena região central dos

epítomos 16-20 e alguns epítomos isolados. O reconhecimento pelos três soros foi bem parecido em todos os casos, porém na região carboxi-terminal o soro anti-veneno obteve maior reconhecimento do que os demais soros principalmente no epítomo 42 (Fig. 31 b).

Os epítomos referentes à toxina Ts2 apresentaram coloração mais intensa nas porções amino-terminal e na porção carboxi-terminal com exceção dos epítomos 44-46 e uma pequena região central dos epítomos 14-20 e alguns epítomos isolados. O reconhecimento pelos três soros foi bastante próximo em quase todos os casos, contudo, o soro anti-veneno obteve maior reconhecimento do que os demais soros principalmente no epítomo 42 e 43 que obteve reconhecimento praticamente apenas deste soro. (Fig. 31 c).

Já para os epítomos referentes à Ts3, os soros específicos apresentaram um reconhecimento muito maior do que o soro anti-veneno. Esta toxina apresentou maior reconhecimento em três regiões entre os pontos 3-5, 12-20 e 43-50, sendo que a porção carboxi-terminal apresentou os maiores valores para esta toxina. Em relação aos soros anti-pET26/Ts3 com e sem dose de veneno, os pontos 46 e 47 apresentaram reconhecimento muito superior do que o soro anti-veneno (Fig. 31 d).

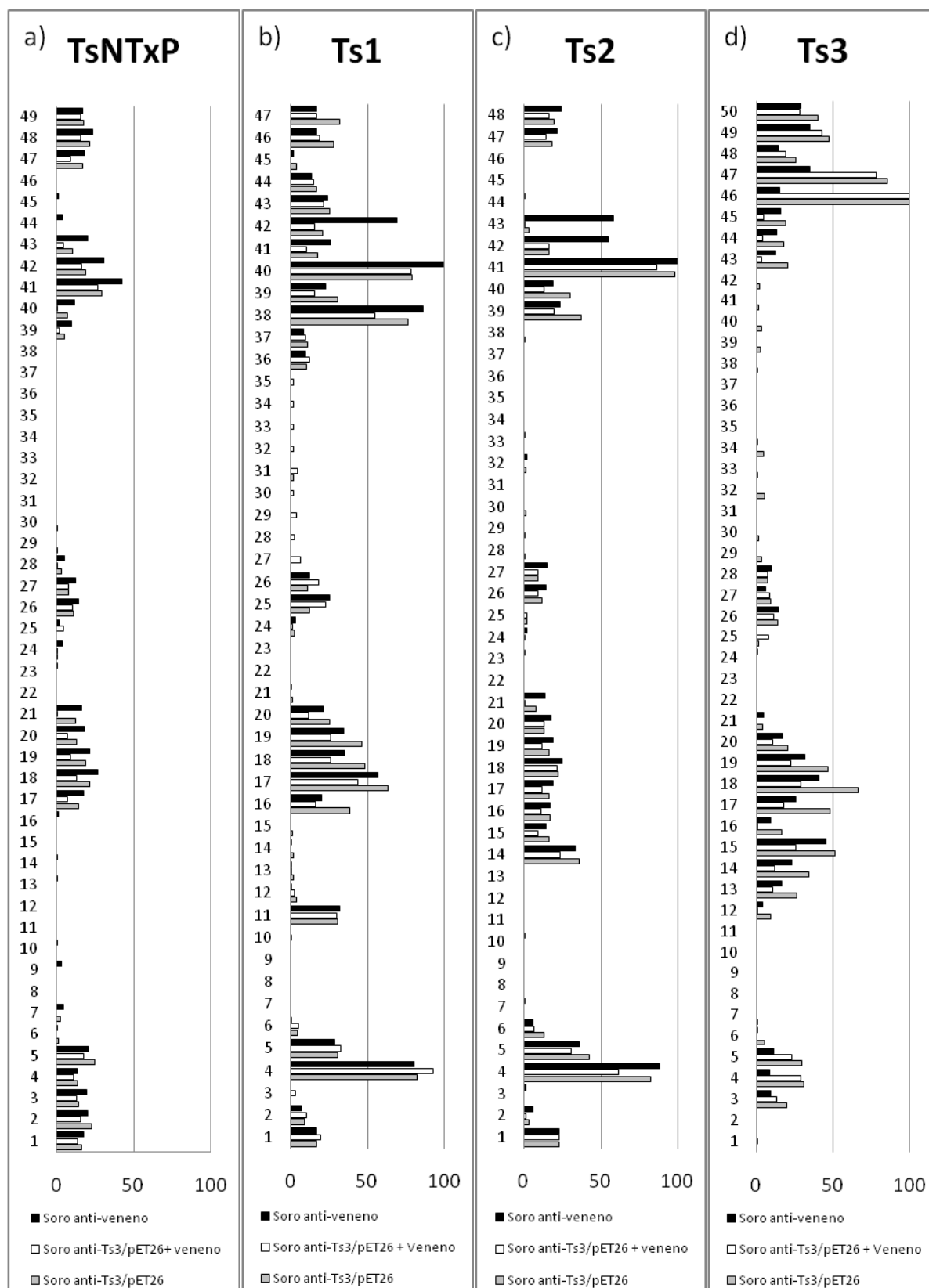


Figura 31: Reatividade dos epítomos em relação aos soros testados por toxina.

Reatividade dos soros imunes testados frente à membrana de SPOT com epítomos lineares das toxinas Ts1, Ts2, Ts3 e da proteína TsNTxP do veneno de *T. serrulatus*. Apresentando diferentes níveis de reconhecimento pelos soros testados em relação ao mesmo epítopo linear.

8. Discussão

Casos de envenenamento por escorpiões é um problema antigo enfrentado por diversas populações do mundo, no Brasil este fato não é diferente, principalmente para o estado de Minas Gerais. Mesmo com a produção de um soro eficiente já ser recorrente, ainda existe vários casos de óbitos decorrentes de acidentes com *T. serrulatus*. Outro problema enfrentado é a baixa sobrevivência dos cavalos imunizados com veneno bruto devido à sua toxicidade elevada, fazendo com que o rebanho seja sempre renovado.

Os acidentes por animais peçonhentos foram reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde como doenças não atendidas ou negligenciadas. Incluído neste panorama estão os casos de acidentes por escorpiões, que em 2007, apenas no estado de Minas Gerais, foram notificados 8.467 casos, no mesmo período e região foram notificados 3.704 casos de Dengue e em média 3.350 casos de Leishmaniose no Brasil, entre outras doenças (disponível *on line* em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue1203.pdf> e http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_lv.pdf). Estes dados mostram que o escorpionismo é um grave problema de saúde pública e que não recebe a devida importância em relação a outras doenças negligenciadas.

Por estes motivos a produção de soros mais eficientes e utilizando-se antígenos não tóxicos se torna uma atrativa alternativa para se evitar estes problemas decorrentes. Este trabalho aborda o uso de toxinas recombinantes sem atividade farmacológica como imunógenos para se substituir ou ser utilizado em conjunto com o veneno bruto na imunização dos animais.

O primeiro passo deste trabalho foi à clonagem da Ts3 utilizando duas endonucleases de restrição diferentes, esta estratégia se mostra mais eficiente, uma vez que havia uma chance significativamente baixa da ligação da Ts3 aos vetores pET de maneira invertida, devido à incompatibilidade de bases nas extremidades coesivas dos vetores e da Ts3. Além disso, a circularização do vetor sem nenhum inserto também se torna mais difícil, o que gera a obtenção de pouquíssimos clones sem inserto ou com o inserto invertido, Dutra *et. al.*, 2008 encontraram resultados semelhantes.

Alguns clones dos vetores pET sem inserto, verificados por PCR, devem ter sido gerados por digestão incompleta do vetor onde apenas uma das fitas é digerida, deixando o plasmídeo desespiralado, ou o vetor pode ter sido cortado por apenas uma das enzimas, sendo assim, o vetor pode se desespiralar e apresentar peso molecular compatível com o vetor linearizado. Durante a reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase, o vetor semi-digerido se religa e assim fica estável podendo inclusive ser transformado.

Os resultados referentes à expressão da Ts3 clonada em pET26b não foram satisfatórios em relação ao processamento do *pelB leader* fusionado a Ts3, este fato pode se dever a incapacidade das linhagens utilizadas neste trabalho em exportarem a Ts3 recombinante ao espaço periplasmático onde é realizada a formação de pontes dissulfeto (de Marco, 2009). Além disso, o corte entre o *pelB leader* e a Ts3 realizado pela *signal peptidase* que se mantém ativa apenas no periplasma bacteriano, é importante para que a proteína recombinante forme suas pontes dissulfeto. Entretanto a figura 20 apresenta uma pequena quantidade de Ts3 recombinante na fração periplasmática que se deve ao fato de ter sido aplicado muito material nesta linha, fazendo com que quantidades ínfimas de Ts3 recombinante apareçam no gel (Hauser & Ryan 2007).

A expressão de pET32/Ts3, apresentou níveis maiores de produção do que a expressão em pET26/Ts3, sugerindo que a tiorredoxina pode estabilizar melhor a expressão. Proteínas pequenas também podem ser mais instáveis no citoplasma bacteriano e por isso são mais degradadas do que proteínas grandes o que explica os maiores níveis de Ts3 expressa em pET-32c (Rabbani *et. al.*, 1988; Parsell & Sauer, 1989).

Uma desvantagem da expressão da pET32/Ts3 é o fato de sua proteína de fusão representar aproximadamente 70% da massa total da proteína recombinante. Sendo assim há necessidade do uso de uma protease para a liberação da Ts3 recombinante. Mesmo a enteroquinase conseguindo um bom desempenho de clivagem, esta é uma protease de custo elevado aumentando os custos de produção. O vetor pET-32c possui duas caudas de histidinas, uma se localiza fusionada na porção c-terminal da proteína de interesse e a outra está entre a tiorredoxina e a *S-tag* (que funciona para a detecção imunológica e para purificação) dessa maneira uma segunda purificação para a separação da Ts3 da proteína de fusão utilizando a coluna de Ni-NTA seria inviável de maneira que a cauda de fusão com a tiorredoxina e a Ts3 possuem uma cauda de histidina, necessitando, portanto, de outro método de purificação.

Foi observado durante a expressão da Ts3 em ambas as construções com os vetores pET o fato da linhagem Origami 2 (DE3) não necessitar de indução por IPTG para produzir a Ts3 recombinante. Outras linhagens de Origami como as Origami B, possuem uma mutação no gene *lacY1* da permease que impede o transporte ativo do IPTG via *Lac permease*, para estas linhagens é recomendado o uso de quantidades menores de IPTG para a indução da expressão, no entanto estas linhagens também são resistentes a canamicina, o que as impede de serem utilizadas com o vetor pET-26b que confere resistência a este antibiótico. A linhagem Origami 2 (DE3), sensível a canamicina e utilizada neste trabalho não apresenta a mutação em *lacY1*, foi verificado durante os testes de expressão que a cultura não induzida produzia a proteína heteróloga enquanto a cultura

induzida não apresentava expressão. Mesmo os experimentos sendo repetidos diversas vezes, não houve mudanças no resultado, o que contribui para abaixar o custo projeto. Como este fato não foi objetivo do trabalho, não será discutido com mais detalhes, porém pretendemos sequenciar a região promotora e do indutor para a verificação de uma mutação diferente da *lacY1* que justifique este fenótipo.

A expressão de pET32/Ts3 se apresentou mais solúvel em comparação a expressão de pET26/Ts3, para ambas, as expressões em Origami 2 (DE3) a temperaturas mais baixas apresentaram melhores resultados do que as outras linhagens, além da expressão sem IPTG, esta linhagem foi selecionada para expressões em maior escala (Sørensen & Mortensen, 2005). Possivelmente esta maior solubilidade encontrada na construção pET32/Ts3 foi devida a fusão com a cauda de tiorredoxina que aumenta a solubilidade de proteínas ligadas a ela, além, de facilitar a formação de pontes dissulfeto o que pode ajudar na solubilidade da Ts3 recombinante (La Vallie *et. al.*, 1993). A possível ausência de pontes dissulfeto pode ter feito com que os aminoácidos das proteínas de fusão tenham interagido com os resíduos da Ts3, adquirindo assim conformação tridimensional muito diferente de sua nativa, o que pode ter levado a Ts3 se apresentar, de maneira mais efetiva, insolúvel em corpos de inclusão ou ainda a própria bactéria a não reconhecer a Ts3 recombinante induziu a formação desses corpos de inclusão (Singh & Panda, 2005). A imunização dos animais não foi realizada com corpos de inclusão devido à maior facilidade de purificação através da coluna, o que diminui o tempo de purificação, tendo também a Ts3 recombinante purificada por este método possui maior chance de permanecer com uma conformação tridimensional mais parecida com a Ts3 nativa. Porém nosso grupo já utilizou copos de inclusão com sucesso na imunização de animais (Souza *et. al.*, 2010; Lobato *et. al.*, 2010).

As purificações da Ts3 recombinante obtiveram bons níveis mesmo com a pouca quantidade de pET26/Ts3 solúvel disponível. Apesar de obter um rendimento de cerca de 20 mg/L a purificação revelou a presença de algumas proteínas contaminantes, provavelmente estas proteínas possuem alta quantidade de resíduos de histidinas, fazendo com que elas se liguem de maneira mais forte a coluna de purificação, sendo retiradas apenas na eluição.

O ensaio de toxicidade da Ts3 recombinante expressa em ambos os vetores demonstrou a inatividade desta toxina recombinante, uma vez que não foi verificado nenhum sintoma ou sinal de intoxicação em nenhum dos camundongos testados. Este fato sugere duas hipóteses: de que a Ts3 recombinante não possui sua conformação tridimensional correta, e que desta maneira seu sítio ativo não foi capaz de se ligar ao canal para sódio produzindo seu efeito descrito, outra possibilidade é a de que os resíduos provindos da sequência do vetor, incluindo a cauda de histidina, inibiram sua ação tóxica, principalmente para a pET26/Ts3 em que o seu peptídeo sinal não foi processado. Estes resultados são

reforçado por Xu *et. al.*, 2008 que avaliaram a atividade da toxina *BmK IT* expressa com fusão de cauda de histidinha e *inteína DnaB* nas porções n-terminal ou c-terminal, demonstrando que a posição de caudas de fusão influencia diretamente a atividade da toxina quanto o seu processamento.

O experimento de SPOT utilizou membranas que possuíam a sequência de toxinas de *T. serrulatus* que atuam em canais para sódio, Ts1, Ts2 e TsNTxp, que é uma proteína imunógena deste veneno, além da toxina Ts3. Foram revelados vários epítomos lineares reconhecidos pelos soros contra Ts3 recombinante em sequências de todas as toxinas presentes na membrana.

Ts3 revelou apresentar vários anticorpos contra epítomos lineares, principalmente em sua porção c-terminal, levando em consideração os soros anti-pET26/Ts3 e anti-pET26/Ts3 + veneno, Alvarenga *et. al.* em 2002 encontrou pelo método de SPOT o epítomo linear “VHILCYCYGLPDSEPTKTNGKCK” fortemente reconhecido pelo soro anti-Ts3 nativa. Os epítomos 46 e 47 correspondentes aos resíduos “YCYGLPDSEPTKTNGK” da sequência de Ts3 apresentaram os valores mais altos, indicando que este trecho da pET26/Ts3 provocou forte produção de anticorpos coincidentes com resultados anteriores. O soro anti-veneno bruto reconheceu os mesmos epítomos que os soros anti-recombinante, porém com uma intensidade de sinal muito baixa em todos os pontos reconhecidos.

Os soros anti-Ts3 recombinante (com e sem dose de veneno bruto) também foram capazes de reconhecer epítomos de outras toxinas, indicando que existe reação cruzada entre as toxinas utilizadas, porém o soro anti-veneno bruto revelou outros epítomos não reconhecidos pelos soros anti-Ts3 recombinante. Guatimosin *et. al.*, 2000 apresentaram resultados promissores com a produção de soro anti-TsNTxP recombinante que foi capaz de neutralizar 20 DL₅₀ de veneno mostrando forte reação cruzada com o veneno bruto, Mendes *et. al.*, 2008 utilizaram a toxina Ts1 recombinante e obteve baixo poder de neutralização contra o veneno bruto, no entanto o soro anti-Ts1 recombinante conseguiu neutralizar 14 DL₅₀ de Ts1 nativa. Estes resultados obtidos em nosso grupo indicando a necessidade do uso de outras toxinas para a produção de um soro de melhor qualidade, uma vez que o soro contra cada componente recombinante do veneno apresenta um potencial de neutralização diferente.

A pET26/Ts3 foi reconhecida pelos soros anti-Ts3 recombinante e também obteve melhor resultado para o soro anti-veneno, indicando que os anticorpos produzidos contra o veneno conseguem se ligar a Ts3 recombinante. A construção pET32/Ts3 apresentou valores de reconhecimento menores do que a construção pET26/Ts3, indicando que as proteínas de fusão podem ter interferido no reconhecimento desta recombinante. Outro fator

que pode ter influenciado este resultado é o fato que foi utilizado a construção pET32/Ts3 sem corte pela enteroquinase, sendo que apenas 30% da massa protéica total utilizada representa a Ts3.

A Ts3 nativa obteve baixo reconhecimento pelo soro anti-Ts3 recombinante, este fato pode indicar que os anticorpos produzidos contra a Ts3 recombinante reconhecem epítomos diferentes da Ts3 nativa, como epítomos tridimensionais ou epítomos que são formados por resíduos que na Ts3 nativa não são expostos na superfície da toxina. Maria *et. al.*, 2005 conseguiu relacionar alguns epítomos que possuem correlação com o potencial de neutralização do veneno, ela utilizou soro de nove cavalos imunizados com veneno bruto de *T. serrulatus*, sendo que cada animal apresentou um padrão de reconhecimento a membrana de SPOT diferente, Machado de Avila *et. al.*, 2004 observou resultados semelhantes com camundongos imunizados com veneno bruto, estes trabalhos indicam que cada animal apresenta anticorpos que reconhecem pontos diferentes das toxinas o que influi diretamente em seu potencial de neutralização. Entretanto o soro contra a Ts3 recombinante após receber apenas uma dose de veneno obteve um salto muito alto de reconhecimento, indicando que as previas imunizações com a Ts3 recombinante serviram para preparar o sistema imunológico do coelho para produzir anticorpos contra antígenos parecidos com a Ts3 por já terem contato com sua sequência, mesmo que na conformação tridimensional inadequada (Souza *et. al.*, 2010). Já o soro anti-veneno de *T. serrulatus* obteve reconhecimento maior do que o soro anti-Ts3 recombinante + veneno. Isto pode se dever ao fato das toxinas de *T. serrulatus* possuírem similaridades de sequencias o que leva a produção de anticorpos que reconheçam mais de uma toxina, sendo possível o reconhecimento da Ts3 nativa por anticorpos gerados contra outras toxinas que apresentem certo grau de similaridade, assim os anticorpos específicos contra a Ts3 mais anticorpos produzidos contra outras toxinas se ligam em mais pontos da TS3 ativa e geram um reconhecimento mais alto para esta toxina nativa frente ao soro anti-veneno do que o soro anti-Ts3 recombinante (Duarte, *et. al.*, 2010).

O veneno bruto de *T. serrulatus* utilizado neste trabalho apresentou alta toxicidade quando comparado a outros trabalhos. A DL_{50} deste veneno foi calculada em 3,19 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ enquanto outros trabalhos que utilizaram venenos recém extraídos encontraram valores mais altos, cerca de 6 $\mu\text{g}/20\text{ g}$, para venenos liofilizados o valor da DL_{50} é ainda maior, chegando a cerca de 30 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ (Kalapothakis & Chaves-Olórtegui, 1997; Mendes, 2008; Duarte, 2010; Maria, 2005). Este fato sugere que os venenos dos escorpiões utilizados neste trabalho podem prover de uma população que possui maior toxicidade de seu veneno, corroborando com os dados encontrados por Kalapothakis & Chaves-Olórtegui em 1997 quando verificaram variações na composição de venenos de diversos espécimes de *T.*

serrulatus e que obtinham valores de ELISA e DL₅₀ diferentes dependendo da proporção entre as α e β toxinas destes venenos.

O ensaio de neutralização do veneno utilizando o soro anti-Ts3 recombinante não apresentou resultados satisfatórios. Este soro não foi capaz de neutralizar nem 1 DL₅₀ do veneno, indicando que os anticorpos produzidos contra a Ts3 recombinante não são eficazes na proteção contra o veneno bruto, possivelmente pelos anticorpos produzidos pelo soro anti-Ts3 recombinante serem mais específicos a epítomos lineares, que podem estar ocultos na toxina nativa pela conformação tridimensional ou ainda indicam que os anticorpos mais eficazes na proteção são gerados por epítomos conformacionais, que reconhecem regiões próximas a duas fitas, como na região de ligação de uma ponte dissulfeto, uma alça ou em folha- β , além disso o título do soro anti-Ts3 recombinante encontrado no trabalho foi baixo, o que pode ter levado a produção de uma baixa diversidade de anticorpos que reconheçam epítomos diferentes.

Já o soro anti-pET26/Ts3 + veneno foi capaz de proteger contra 1 DL₅₀. Este fato sugere que os anticorpos formados após a dose de veneno já conseguem reconhecer os epítomos conformacionais e de outras toxinas, uma vez que o sistema imune do coelho já estava ativo contra epítomos de sequências próximos a toxinas. Outros reforços de veneno poderiam ser utilizados a fim de melhorar a capacidade de neutralização deste soro, no entanto seria interessante que os reforços fossem realizados apenas com toxinas recombinantes e no máximo um reforço de veneno para que o animal consiga produzir um soro com alto poder neutralizante sem necessidade de reforços de veneno.

Mesmo com desempenho baixo na neutralização do veneno bruto pelo soro anti-Ts3 recombinante, não foi testada a eficiência dos soros anti Ts3 recombinante contra a Ts3 nativa devida à indisponibilidade desta toxina purificada em nosso laboratório. Mendes, *et. al.*, em 2008 trabalhou com outro componente do veneno, a toxina Ts1 e obteve proteção contra 2 DL₅₀ contra o veneno bruto e 14 DL₅₀ contra a Ts1 nativa. Infelizmente não dispúnhamos de quantidade suficiente de Ts3 nativa para os ensaios de neutralização *in vivo*, porém pretendemos realizar este experimento assim que possível. Estes resultados sugerem que o soro anti-Ts3 recombinante pode ter poder de proteção apenas contra a Ts3 nativa.

A capacidade individual de cada animal utilizado para a produção de anticorpos, modelos animais diferentes podem produzir soros com poder de neutralização diferente. Mendes *et. al.* em 2004 demonstraram este fato ao avaliar três modelos animais. Além de produzirem potencias de soros diferentes, indivíduos da mesma espécie podem apresentar variações nos tipos de anticorpos produzidos contra os mesmos antígenos e com isso

apresentarem valores diferentes de reconhecimento por ELISA e até mesmo por SPOT (Maria *et. al.*, 2005). Estes fatos indicam que é possível que o coelho imunizado com Ts3-recombinante não apresentasse bom desempenho na produção de anticorpos capazes de neutralizar o veneno bruto. Infelizmente um dos coelhos imunizados com pET26/Ts3, após a 5ª dose foi sacrificado acidentalmente, dessa maneira os soros anti-Ts3 recombinante utilizados foram de apenas um dos coelhos.

A toxina Ts3 demonstrou ser imunogênica por diversos ensaios, além de ser apontada como a toxina mais letal do veneno de *T. serrulatus* (Kalapothakis & Chaves Olórtgui, 1997; Alvarenga *et. al.*, 2002). No entanto a Ts3 recombinante apresentou resultados quanto aos diversos experimentos realizados, o que nos indica que possivelmente a Ts3 recombinante não estava em sua conformação tridimensional correta, levando a produção de anticorpos contra epítomos lineares ou epítomos conformacionais diferentes da toxina nativa devida à expressão heteróloga. A Ts3 recombinante demonstrou ser capaz de obter reconhecimento em ELISA e SPOT revelando reação cruzada em epítomos de outras toxinas, todavia não apresentou capacidade de neutralização. Sugerindo que os anticorpos mais eficientes envolvidos na neutralização desta toxina são formados por epítomos conformacionais que não estavam presentes na Ts3 recombinante.

8.1 Perspectivas

Com os resultados deste trabalho pretendemos realizar novas construções utilizando a Ts3 em outros vetores e linhagens bacterianas para se obter a Ts3 em sua conformação tridimensional adequada para novos ensaios imunológicos.

Outro trabalho que será desenvolvido é a construção de novos cassetes de expressão utilizando outros componentes do veneno ainda não averiguados quanto ao seu poder de proteção bem como uma proteína quimérica contendo as principais toxinas deste veneno.

9. Conclusão

Ao final deste trabalho conseguimos chegar a algumas conclusões pertinentes em relação à expressão de proteínas heterólogas na imunização de animais. A presença de caudas nas proteínas utilizadas na imunização, não afeta de maneira significativa o reconhecimento dos soros produzidos frente a Ts3 recombinante por reações de ELISA e a ligação dos anticorpos produzidos contra a Ts3 recombinante reconhecendo os SPOT's, porém o bom reconhecimento destes antígenos não garante que os anticorpos produzidos possuem a capacidade de neutralização. Os estudos para a utilização de antígenos recombinantes ainda precisam de aperfeiçoamento, principalmente na obtenção de linhagens e vetores de expressão que satisfaçam a necessidade de correta estruturação tridimensional dos antígenos para que se possa gerar uma resposta imune com grande poder de imunização.

10. Referências Bibliográficas

- ADAM, K. R. & WEISS, C. The occurrence of 5-hidroxytryptamine in scorpion venom. J. Exp. Biol., v.35, p.39-41. 1958.
- ALMEIDA, F. M.; PIMENTA, A. M.; DE FIGUEIREDO, S. G.; SANTORO, M. M.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; DINIZ, C. R.; DE LIMA, M. E. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. Toxicon, 40(7), 1041-1045. 2002.
- ALTSCHUL S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 5;215(3):403-10. 1990.
- ALVARENGA, L. M.; DINIZ, C. R.; GRANIER, C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. Toxicon, v.40, n.1, Jan, p.89-95. 2002.
- ALVARENGA, L. M.; MACHADO DE AVILA, R. A.; AMIM, P. R.; MARTINS, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. G.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, 46(6), 664-671, 2005.
- ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. Toxicon, 27(8), 907-916. 1989.
- ARANTES, E. C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S. V.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of TsTX-V, A new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. Biochim. Biophys. Acta, 1199(1), 69-75. 1994.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. In Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York. 1989.
- BARHANING, J.; GIGLIO, J. R.; LÉOPOLD, P.; SCHMID, A.; SAMPAIO, S. V.; LAZDUNSKI, M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *Tityus* gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. J. Biol. Chem., 257(21), 12553-12558. 1982.
- BARHANING, J.; IDELFONSE, M.; ROUGIER, O.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LAZDUNSKI, M. *Tityus* gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. Plugers Archs., 400(1), 22-27. 1984.
- BARHANING, J.; PAURON, D.; LOMBET, A.; NORMAN, R. I.; VIJVERBERG, H. P. M.; GIGLIO, J. R.; LAZDUNSKI, M. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus* gamma toxin receptor associated with the gating component of the Na⁺ channel from rat brain. EMBO J., 2(6), 915-920. 1983.
- BARROS, E. F. Aspectos anatomopatológicos do sistema nervoso central na intoxicação escorpônica. O Hospital, n.3, p.423. 1937.
- BARROS, E. F. Aspectos clínicos da intoxicação escorpônica. Mem. Inst. Biol. Ezequiel Dias, n.Tomo II, p.103. 1938.

BATISTA, C. V.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; HAJDU, P.; PANYI, G.; GASPAR, R. e POSSANI, L. D. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+)- channels with distinctly different affinities. Biochim Biophys Acta, v.1601, n.2, Dec 16, p.123-31. 2002.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F. I.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANDA, E. S.; FLETCHER, P. L. JR, MARTIN, B. M.; POSSANI, L. D. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. Biochem J. Feb 1;313 (Pt 3):753-60. 1996.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; MEJÍA, M. C.; MARTIN, B. M.; LUCAS, S.; BOLIVAR, F.; POSSANI, L. D. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. FEBS Lett., 335(1), 6-8. 1993.

BLANC, E.; LECOMTE, C.; RIETSCHOTEN, J. V.; SABATIER, J. M.; DARBON, H. Solution structure of TsKapa, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels. Proteins, 29(3), 359-369. 1997.

BLAUSTEIN, M. P.; ROGOWSKI, R. S.; SCHNEIDER, M. J.; KRUEGER, B. K. Polypeptide toxins from the venoms of old world and new world scorpion preferentially block different potassium channels. Mol. Pharmacol., 40(6), 932-942. 1991.

BOMFIM, J. H. G. G.; GODOY, M. A. F.; GIGLIO, J. R.; DE OLIVEIRA, A. M.; ARANTES, E. C. Effects induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxins TsTX-I and TsTX-V on the rat isolated retractor penis muscle. Pharmacology, 73(4), 190-198. 2005.

BORGES, A.; BERMINGHAM, E.; HERRERA, N.; ALFONZO, M. J.; SANJUR, O. I. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): the historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. Toxicon. Feb-Mar; 55(2-3):436-54. 2010.

BORTOLUZZI, L. R.; QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Biota Neotrop. vol.7, n.3, pp. 357-359. ISSN 1676-0603. 2007.

BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; DUCANCEL, F.; ZENOUAKI, I.; BEN KHALIFA, R.; BORCHANI, L.; PELHATE, M.; BOULAIN, J. C.; EL AYEB, M.; MENEZ, A. e KAROUI, H. A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. Eur J Biochem, v.238, n.3, Jun 15, p.653-60. 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

CAMPOS F. V., CHANDA B., BEIRÃO P. S., BEZANILLA F. Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. J. Gen. Physiol. 132, 251–263. 2008.

CAMPOS, F.V. & BEIRÃO, P.S.L. Effects of bound Ts3 on voltage dependence of sodium channel transitions to and from inactivation and energetics of its unbinding. Cell Biochem. Biophys. 44 : 424 – 430 . 2006.

CAMPOS, F. V.; CORONAS, F. I.; BEIRÃO, P. S. L. Voltage-dependent displacement of the scorpion toxin Ts3 from sodium channels and its implication on the control of inactivation. Br. J. Pharmacol. 142 : 1115 – 1122 . 2004.

CAMPOS, J. A.; SILVA, O. S.; LOPEZ, M., FREIRE-MAIA, L. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion sting in children. In: Eaker, D. & Wodstrom, T., eds., Natural Toxins, Oxford Pergamon Press, pp. 61-68. 1980.

CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D. e MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. Nature, v.296, n.5852, Mar 4, p.90-1. 1982.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.20, p.15-43. 1980.

CHAGOT, B.; PIMENTEL, C.; DAI, L.; PIL, J.; TYTGAT, J.; NAKAJIMA, T.; CORZO, G.; DARBON, H. e FERRAT, G. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. Biochem J, v.388, n.Pt 1, May 15, p.263-71. 2005.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, A.M.; MOREIRA FERREIRA, M.; DO NAS ; CORDEIRO, M. N. ; MARIA, W. S. ; RICHARDSON, M. ; DINIZ, C. R. . Immunological and chemical properties of a non Immunological and chemical properties of a non-toxic protein from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello, 1922).. Envenoming And Their Trearments, Fondation Marcel Mérieux, p. 183-195, 1996.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; FERREIRA, A.M.; FERREIRA, A.P.; DINIZ, C.R. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. Toxicon, 35(2), 213-221. 1997.

CHUANG, R. S.; JAFFE, H.; CRIBBS, L.; PEREZ-REYES, E.; SWARTZ, K. J. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. Nat Neurosci, v.1, n.8, Dec, p.668-74. 1998.

CLEMENTE, G. T.; TEIXEIRA, M. M.; FREIRE-MAIA, L.; ROSSONI, R. B. Mechanisms underlying the structural alterations of the rat submandibular gland induced by *Tityus serrulatus* Tityustoxin. Toxicon, 40(6), 731-738. 2002.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Spider, scorpion, centipedes and mites. Oxford: Pergamon Press. 278 p. 1968.

COLLINS-RACIE, L. A.; MCCOLGAN, J. M.; GRANT, K. L.; DIBLASIO-SMITH, E. A.; MCCOY, J. M.; LAVALLIE, E. R. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. Biotechnology (N Y). 1995 Sep;13(9):982-7.

COLOGNA, C. T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* venom and toxins: An overview. Protein and Peptide Letters, v. 16, p. 920-932, 2009.

CORONA, M.; GURROLA, G. B.; MERINO, E.; CASSULINI, R. R.; VALDEZCRUZ, N. A.; GARCIA, B.; RAMIREZ-DOMINGUEZ, M. E.; CORONAS, F. I.; ZAMUDIO, F. Z.; WANKE, E. e POSSANI, L. D. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. FEBS Lett, v.532, n.1-2, Dec 4, p.121-6. 2002.

CORONA, M.; ZURITA, M.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B. Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. Toxicon, 34(2), 251-256. 1996.

CORONAS, F. V.; DE ROODT, A. R.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; ZAMUDIO, F. Z.; BATISTA, C. V. F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D. Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁺-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion. Toxicon, 41(2), 173-179. 2003.

COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J. M.; ROCHAT, H. Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon, v.20, n.1, p.9-16. 1982.

COUTINHO-NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina. Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, 1975.

CRUZ, J.S.; MATAVEL, A.C.S.; LEÃO-FILHO, H.M.; MORAES-SANTOS, T.; BEIRÃO, P.S.L. *Tityustoxin* effect on nerve compound action potentials requires extracellular sodium. Neuroscience Lett., 282(1-2), 25-28. 2000.

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, J. S. M.; ERING, S. E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 36(1): 67-76, 1994.

DAI, L.; CORZO, G.; NAOIKI, H.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. Biochem Biophys Res Commun, v.293, n.5, May 24, p.1514-22. 2002.

DAI, L.; YASUDA, A.; NAOIKI, H.; CORZO, G.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. Biochem Biophys Res Commun, v.286, n.4, Aug 31, p.820-5. 2001.

DE MARCO, A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact. May 14;8:26. 2009.

DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. Am J Physiol, v.264, n.2 Pt 1, Feb, p.C361-9. 1993.

DIEGO-GARCIA, E.; BATISTA, C. V.; GARCIA-GOMEZ, B. I.; LUCAS, S.; CANDIDO, D. M.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. Toxicon, v.45, n.3, Mar 1, p.273-83. 2005.

DINIZ, C. R. & GONCALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. Biochim Biophys Acta, v.41, Jul 15, p.470-7. 1960.

DRUMOND, Y. A.; COUTO, A. S.; MORAES-SANTOS, T.; ALMEIDA, A. P. e FREIRE-MAIA, L. Effects of toxin Ts-gamma and *Tityustoxin* purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom on isolated rat atria. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, v.111, n.2, Jun, p.183-90. 1995.

DUARTE, C. G.; ALVARENGA, L. M.; DIAS-LOPES, C.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. Vaccine. Feb 3;28(5):1168-76. Epub 2009 Nov 28. 2010.

DUTRA, A. A.; SOUSA, L. O.; RESENDE, R. R.; BRANDÃO, R. L.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I. M. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. Peptides. 2008 Sep;29(9):1505-13. Epub 2008 May 7.

ECCLES, C.U.; ROGOWSKI, R.S.; GU, X.; ALGER, B.E.; BLAUSTEIN, M.P. Tityustoxin-K α , from scorpion venom, blocks voltage-gated, non-inactivating potassium current in cultured central neurons. Neuropharmacol., 33(12), 1523-1528. 1994.

ELLIS, K. C.; TENENHOLZ, T. C.; JERNG, H.; HAYHURST, M.; DUDLAK, C. S.; GILLY, W. F.; BLAUSTEIN, M. P.; WEBER, D. J. Interaction of a toxin from the scorpion *Tityus serrulatus* with a cloned K⁺ channel from squid (sqKv1A). Biochemistry, 40(20), 5942-5953. 2001.

FAJLOUN, Z.; FERRAT, G.; CARLIER, E.; FATHALLAH, M.; LECOMTE, C.; SANDOZ, G.; DI LUCCIO, E.; MABROUK, K.; LEGROS, C.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; SABATIER, J. M.; DE WAARD, M. Synthesis, ¹H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins. J Biol Chem, v.275, n.18, May 5, p.13605-12. 2000.

FERREIRA, L. A.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiador isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, 31(8), 941-947. 1993.

FIGUEIREDO, J. E. F.; KALAPOTHAKIS, E. ; GOMEZ, M. V. ; BRESSAN, W . Heterologous expression of an insecticidal gene from the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, v. 14, p. 274-293, 2008.

FLETCHER, P. L. JR.; FLETCHER, M. D.; WENINGER, K.; ANDERSON, T. E.; MARTIN, B. M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. J Biol Chem. 5;285(10):7405-16. 2010.

FONTECILLA-CAMPS, J. C. Three-dimensional model of the insect-directed scorpion toxin from *Androctonus australis Hector* and its implication for the evolution of scorpion toxins in general. J Mol Evol, v.29, n.1, Jul, p.63-7. 1989.

FROY, O. & GUREVITZ, M. New insight on scorpion divergence inferred from comparative analysis of toxin structure, pharmacology and distribution. Toxicon, v.42, n.5, Oct, p.549-55. 2003.

FUKUHARA, Y. D.; REIS, M. L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F. Q.; DONADI, E. A. Increase Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. Toxicon, 41 (1), pp. 49-55. E.A. 2003

GARCIA, C.; CALDERON-ARANDA, E. S.; ANGUIANO, G. A.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffmann. Toxicon, v.41, n.4, Mar, p.417-27. 2003.

GOMEZ, M. V. & DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the brazillian scorpion *Tityus serrulatus* venom. Mem Inst Butantan, v.33, n.3, p.899-902. 1966.

GOMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, M. A. M. Effects of *Tityustoxin* on central nervous system. J. Toxicol. Toxin Rev., 14, 437-456. 1995a.

GOMEZ, R. S.; CASALI, T. A.; ROMANO-SILVA, M. A.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; MORAES-SANTOS, T.; PRADO, M. A. e GOMEZ, M. V. The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by *Tityustoxin* and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. Neurosci Lett, v.196, n.1-2, Aug 18, p.131-3. 1995b.

GORDON, D. & GUREVITZ, M. The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. Toxicon, v.41, n.2, Feb, p.125-8. 2003.

GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M.; ZINN-JUSTIN, S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. J. Toxicol - Toxin Rev., v.17, p.131-159. 1998.

GOUDET, C.; CHI, C. W. e TYTGAT, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon, v.40, n.9, Sep, p.1239-58. 2002.

GOYFFON, M., VACHON, M., BROGLIO, N. Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. Toxicon 20, 337-344. 1982.

GUARNIERI, M. C. XXII Congresso Brasileiro de Zoologia. Ação deletéria e benéfica das peçonhas de serpentes, aranhas, escorpiões e insetos. Recife, 16-21 p. 1998.

GUATIMOSIM S. C. F., KALAPOTHAKIS E., DINIZ C. R., CHAVEZ-OLORTEGUI C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. Toxicon, 38 (1), pp. 113-121. 2000.

GUIDINE, P. A.; MESQUITA, M. B.; MORAES-SANTOS, T.; MASSENSINI, A. R.; MORAES, M. F. Electroencephalographic evidence of brainstem recruitment during scorpion envenomation. Neurotoxicology. 30(1):90-6. Epub 2008 Oct 17. 2009.

GURROLA, G. B.; AREVALO, C.; SREEKUMAR, R.; LOKUTA, A. J.; WALKER, J. W.; VALDIVIA, H. H. Activation of ryanodine receptors by imperatoxin A and a peptide segment of the II-III loop of the dihydropyridine receptor. J Biol Chem, v.274, n.12, Mar 19, p.7879-86. 1999.

GWEE, M. C. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHEAH, L. S.; WONG, P. T. H.; GONG, J. P.; KINI, R. M. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. J. Toxicol., Toxin Rev. 15, 37– 57. 1996.

HAUSER, P. S. & RYAN, R. O. Expressed protein ligation using an N-terminal cysteine containing fragment generated in vivo from a pelB fusion protein. Protein Expr Purif. Aug;54(2):227-33. Epub 2007 Apr 10. 2007.

HERING, S. E.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P. Escorpionismo. In: S. Schvartsman (Ed.). Plantas venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: Sarvier, Escorpionismo, p.216-227. 1992.

HOLADAY, S. K. JR.; MARTIN, B. M.; FLETCHER, P. L. JR.; KRISHNA, N. R. NMR Solution Structure of Butantoxin. Arch. Biochem. Biophys. 379(1), 18-27. 2000.

ImageJ, programa para análise de imagens, disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>>. Acesso em 20/08/2010.

ISMAIL, M.; EL-ASMAR, M. F. e OSMAN, O. H. Pharmacological studies with scorpion (*Palamneus gravimanus*) venom: evidence for the presence of histamine. Toxicon, v.13, n.1, Feb, p.49-56. 1975.

JONAS, P.; VOGEL, W.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J. R. Toxin g of the scorpion *Tityus serrulatus* modifies both activation and inactivation of sodium permeability of nerve membrane. Pflügers Arch., 407(1), 92-99. 1986.

JOVER, E.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. Biochem Biophys Res Commun, v.95, n.4, Aug 29, p.1607-14. 1980.

KALAPOTHAKIS, E. & CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. Toxicon. Oct;35(10):1523-9. 1997.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S. C.; DE CASTRO, C. S.; MENDES, T. M.; GOMEZ, M. V.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. Toxicon.; 40:1691–1699. 2002.

KALAPOTHAKIS E., JARDIM S., MAGALHAES A. C., MENDES T. M., DE MARCO L., AFONSO L. C., CHAVEZ-OLORTEGUI C. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. Toxicon.;39:679–685. 2001.

KARBER, C. Karber's method of determining LD₅₀. In: J. H. Burn (Ed.). Biological Standardization. London: Oxford University Press. 1937.

KIRSCH, G. E.; SKATTEBOL, A.; POSSANI, L. D.; BROWN, A. M. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. J Gen Physiol, v.93, n.1, Jan, p.67-83. 1989.

KOROLKOVA, Y. V.; BOCHAROV, E. V.; ANGELO, K.; MASLENNIKOV, I. V.; GRINENKO, O. V.; LIPKIN, A. V.; NOSYREVA, E. D.; PLUZHNIKOV, K. A.; OLESEN, S. P.; ARSENIIEV, A. S.; GRISHIN, E. V. New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1. J Biol Chem, v.277, n.45, Nov 8, p.43104-9. 2002.

KOROLKOVA, Y. V.; KOZLOV, S. A.; LIPKIN, A. V.; PLUZHNIKOV, K. A.; HADLEY, J. K.; FILIPPOV, A. K.; BROWN, D. A.; ANGELO, K.; STROBAEK, D.; JESPERSEN, T.; OLESEN, S. P.; JENSEN, B. S.; GRISHIN, E. V. An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*. J Biol Chem, v.276, n.13, Mar 30, p.9868-76. 2001.

KREIL, G. Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. Protein Sci., 4(9), 1666-1669. 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

LA VALLIE, E. R.; DIBLASIO, E. A.; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; MCCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. Biotechnology (N Y). Feb;11(2):187-93. 1993.

LEGROS, C.; CÉARD, B.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M-F. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. FEBS Lett., 431(3), 375-380. 1998.

LEGROS, C.; OUGHUIDENI, R.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P. E. e MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. FEBS Lett, v.390, n.1, Jul 15, p.81-4. 1996.

LEGROS, C.; SCHULZE, C.; GARCIA, M. L.; BOUGIS, P. E.; MARTINEAUCLAIRE, M. F. e PONGS, O. Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. Biochemistry, v.41, n.51, Dec 24, p.15369-75. 2002.

LIMA, E. G. & FREIRE-MAIA, L. Cardiovascular and respiratory effects induced by intracerebroventricular injection of scorpion toxin (*Tityustoxin*) in the rat. Toxicon, 15(3), 225-234. 1977.

LOBATO, F. C.; LIMA, C. G.; ASSIS, R. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R. O.; SALVARANI, F. M.; CARMO, A. O.; CONTIGLI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. Vaccine. Aug 31;28(38):6125-7. Epub 2010 Jul 29. 2010.

LOURENÇO, W. R. & FRANCKE, O. F. Révision des connaissances sur les scorpions cavernicoles (troglobies) (Arachnida, Scorpiones). Mêm. Biospéol., v.12, p.3-7. 1985.

LOURENÇO, W. R. Humicolous microcharmid scorpions: a new genus and species from Madagascar. C R Biol, v.327, n.1, Jan, p.77-83. 2004.

LOURENÇO, W. R. Peut-on parler d'une biogeography du scorpionisme? C. R. Soc. Biogéogr., v.64, p.137-143. 1988.

LOURENÇO, W. R.; CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L.; CUELLAR, O.; VON EICKSTEDT, V. R. D.; BARRAVIERA, B. & KNOX, M. B.,. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. Journal of Venomous Animals and Toxins, 2:121-134, 1996.

LUO, F.; ZENG, X. C.; HAHIN, R.; CAO, Z. J.; LIU, H.; LI, W. X. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism. Peptides, v.26, n.12, Dec, p.2427-33. 2005.

MACHADO DE AVILA, R. A.; ALVARENGA, L. M.; TAVARES, C. A.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. Toxicon, v.44, n.3, Sep 1, p.233-41. 2004.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento da intoxicação pelo veneno dos escorpiões. Mem. Inst. Osw. Cruz, v.Tomo XX1, n.fasc. I. 1928.

MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; DE LIMA, M.H.; ROCHAT, M.H.; ROCHAT, H.; GRANIER, C. The beta-type toxin Ts II from the scorpion *Tityus serrulatus*: amino acid sequence determination and assessment of biological and antigenic properties. Natural Toxins, 1(2), 119-125. 1992.

MARANGONI, S.; GHISO, J.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, B.; FRANGIONE, B. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. J. Protein Chem., 9(5), 595-601. 1990.

MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; DA SILVA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, B. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. Biochim. Biophysys. Acta, 1243(3), 309-314. 1995.

MARCO, L.; AFONSO, L. C. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. Toxicon, 39(5), 679-685. 2001.

MARIA, W. S.; VELARDE, D. T.; ALVARENGA, L. M.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; GRANIER, C. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. Toxicon, v.46, n.2, Aug, p.210-7. 2005.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO B, A.M.; DINIZ, C. R.; ROCHATA, H.; BOUGIS, P.E. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an α -toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS Letters 342 181-184. 1994.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CÉARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P. E. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS Lett. 302(3), 220-222. 1992.

MASSENSINI, A. R.; MORAES-SANTOS, T.; GÓMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA, M. A. Alpha and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. Neuropharmacol. 37(3), 289-297. 1998.

MENDES T. M., MARIA W. S., GRANIER C., CHAVEZ-OLORTEGUI C., KALAPOTHAKIS E. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. Toxicon, 44 (6), pp. 617-624. 2004.

MENDES, T. M.; DIAS, F.; HORTA, C. C.; PENA, I. F.; ARANTES, E. C. KALAPOTHAKIS, E. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. Toxicon. Dec 1;52(7):787-93. 2008.

MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R. e PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. Nature, v.313, p.316-318. 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, dados epidemiológicos sobre dengue, leishmaniose e escorpionismo, disponíveis On line em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue1203.pdf>>, <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_lv.pdf>, <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_ac_escorpioes_bra_00a09_tabela.pdf> e < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/escorpioes2.pdf> > acesso em: 16/01/2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Escorpionismo. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. Escorpionismo, p.39-47. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de controle de escorpiões. – Brasília : Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009.

MIRANDA, F.; KUPEYAN, C.; ROCHAT, H.; ROCHAT, C. e LISSITZKY, S. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. Eur J Biochem, v.16, n.3, Nov, p.514-23. 1970.

MIROUX, B. & WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol. Jul 19; 260(3):289-298. 1996.

MOSBAH, A.; KHARRAT, R.; FAJLOUN, Z.; RENISIO, J. G.; BLANC, E.; SABATIER, J. M.; EL AYEB, M. e DARBON, H. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. Proteins, v.40, n.3, Aug 15, p.436-42. 2000.

NIRTHANAN, S.; PIL, J.; ABDEL-MOTTALEB, Y.; SUGAHARA, Y.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; JOSEPH, J. S.; SATO, K.; TYTGAT, J. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa- KT_x1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. Biochem Pharmacol, v.69, n.4, Feb 15, p.669-78. 2005.

NORTON, R. S. & MCDONOUGH, S. I. Peptides targeting voltage-gated calcium channels. Curr Pharm Des. 14(24): 2480-91. 2008.

NOVELLO, J. C.; ARANTES, E. C.; VARANDA, W. A.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. TsTx-IV, a short chain fourdisulfide-bridge neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom, which acts on Ca²⁺- activated K⁺ channels. Toxicon, 37(4), 651-660. 1999.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GARCIA, B. I.; LOPEZ-GONZALEZ, I.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; ULENS, C.; TYTGAT, J.; FELIX, R.; DARSZON, A. e POSSANI, L. D. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. Biochem Biophys Res Commun, v.299, n.4, Dec 13, p.562-8. 2002.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; SOMODI, S.; FERNANDEZ, J. A.; ZAMUDIO, F. Z.; BECERRIL, B.; VARGA, Z.; PANYI, G.; GASPAR, R. e POSSANI, L. D. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. Toxicon, v.46, n.4, Sep 15, p.418-29. 2005.

OYAMA JR., S.; PRISTOVSEK, P.; FRANZONI, L.; PERTINHEZ, T.A.; SCHININA, E.; LUCKE, C.; RUTERJANS, H.; ARANTES, E.C.; SPISNI, A. Probing the pH-dependent structural features of alfa-KTx12.1 a potassium channel blocker from the scorpion *Tityus serrulatus*. Protein Sci., 14(4), 1025-1038. 2005.

PANEQUE PERES, A. C; NONAKA, P. N.; DE CARVALHO P. DE T.; TOYAMA, M.H.; SILVA, C.A.; VIEIRA, R.P.; DOLHNIKOFF, M.; ZAMUNER, S.R.; DE OLIVEIRA, L.V. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. Toxicon. Jun;53(7-8):779-85. 2009.

PARDO-LOPEZ, L.; GARCIA-VALDES, J.; GURROLA, G. B.; ROBERTSON, G. A. e POSSANI, L. D. Mapping the receptor site for ergtoxin, a specific blocker of ERG channels. FEBS Lett, v.510, n.1-2, Jan 2, p.45-9. 2002.

PARSELL, D. A. & SAUER, R. T. The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. J Biol Chem, v.264, n.13, May 5, p.7590-5. 1989

PENAFORTE, C.; PRADO V. F.; PRADO, M. A. M.; ROMANO-SILVA, M. A.; GUIMARÃES, P. E. M.; MARCO, L. ; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E . Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. Toxicon (Oxford), Inglaterra, v. 38, p. 1443-1449, 2000.

PESSINI, A. C.; TAKAO, T. T.; CAVALHEIRO, E. C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. Toxicon, 39(10), 1495-1504. 2001.

PIMENTA, A. M. C.; MANSUELLE, P.; DINIZ, C. R.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved α -KTx12.1, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus* venom. J. Pept. Sci., 9(2), 132-140. 2003 a.

PIMENTA, A. M. C.; LEGROS, C.; ALMEIDA, F. M.; MANSUELLE, P.; LIMA, M. E.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. Biochem. Biophys. Res. Commun. 301(4), 1086-1092. 2003 b.

PINHEIRO, C. B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 59(3), 405-415. 2003.

POLIKARPOV, I.; JUNIOR, M. S. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; TEPLYAKOV, A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. J. Mol. Biol. 290(1), 175-184. 1999.

POLIS, G. A. The biology of scorpions. Stanford: Stanford University, 1990.

POSSANI, D. L.; MARTIN, B. M.; FLETCHER, M. D.; FLETCHER, P. L. Jr. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. J. Biol. Chem. 266, 3178-3185, 1991.

POSSANI, L. D. Structure of scorpion toxins. In: A. T. Tu (Ed.). Handbook of Natural Toxins. New York: Marcel Dekker, INC., v.2, p.513-550, 1984.

POSSANI, L. D.; ALAGON, A. C.; FLETCHER, P. L., JR.; ERICKSON, B. W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. Arch Biochem Biophys, v.180, n.2, Apr 30, p.394-403. 1977.

POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. Eur J Biochem, v.264, n.2, Sep, p.287-300. 1999.

POSSANI, L. D.; FLETCHER JR., P.L.; FLETCHER, M.; RODE, G.S.; MOCHCA-MORALES, J.; LUCA, S.; CORONAS, F. V.; ALAGON, A.C.; MARTIN, B. M. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. Mem. Inst. Butantan, 54, (2) 35-52, 1992.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; SVENDSEN, I. The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg Res. Commun., v.47, p.285- 289. 1982.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; SVENDSEN, I.; RODE, G. S.; ERICKSON, B. W. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochem J, v.229, n.3, Aug 1, p.739-50. 1985.

POSSANI, L.; STEINMETZ, W. E.; DENT, M. A.; ALAGON, A. C.; WUTHRICH, K. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. Biochim Biophys Acta, v.669, n.2, Jul 28, p.183-92. 1981.

RABBANI, S. A.; YASUDA, T.; BENNETT, H. P.; SUNG, W. L.; ZAHAB, D. M.; TAM, C. S.; GOLTZMAN, D.; HENDY, G. N. Recombinant human parathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli*. Purification and characterization. J Biol Chem, v.263, n.3, Jan 25, p.1307-13. 1988.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 692 p. 1997.

RAZ, S.; RETZKIN, S.; PAVLÍČEK, T.; HOFFMAN, A.; KIMCHI, H.; ZEHAVID, D.; BEILES, A.; NEVO, E. Scorpion biodiversity and interslope divergence at "evolution canyon", lower Nahal Oren microsite, Mt. Carmel, Israel. PLoS One. 4(4):e5214. 2009.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. Adv Cytopharmacol, v.3, p.325-34. 1979.

RODRIGUES, A. R. A.; ARANTES, E. C.; MONJE, F.; STÜHMER, W.; VARANDA, W. A. Tityustoxin-K(alpha) blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. Br. J. Pharmacol., 139(6), 1180-186. 2003.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. Toxicon, v.43, n.8, Jun 15, p.865-75. 2004.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. Toxicon, v.49, n.2, Feb, p.171-80. 2007.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structurefunction relationships and evolution. Toxicon, v.46, n.8, Dec 15, p.831-44. 2005.

ROGOWSKI, R. S.; KRUEGER, B. K.; COLLINS, J. H. e BLAUSTEIN, M. P. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.4, Feb 15, p.1475-9. 1994.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHART, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. e ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. Science, v.239, p.487-491. 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor, 3 Volumes. 1989.

SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; RICCIOPPO NETO, F.; GIGLIO, J. R. Further characterization of toxins T1IV (TsTXIII) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, 29(6), 663 - 672. 1991.

SAMPAIO, S. V.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. Biochem. Mol. Biol. Int., 39(4), 729-740. 1996.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings National Academy of the Science, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SCHNEIDER, M. C. & CELLA, D. M. Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. J Hered. Jul-Aug;101(4):491-6. Epub 2010 Mar 15. 2010.

SCHOLTE, R. G.; CALDEIRA, R. L.; SIMÕES, M. C.; STUTZ, W. H.; SILVA, L. L.; CARVALHO ODOS, S.; OLIVEIRA, G. Inter- and intrapopulational genetic variability of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). Acta Trop. Nov;112(2):97-100. Epub 2009 Jul 10. 2009.

SINGH, S. M. & PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng. Apr;99(4):303-10. 2005.

SISSOM, W. D. Systematics, biogeography and paleontology. In: G. A. Pous (Ed.). *The Biology of Scorpion*. Stanford: Stanfor University Press. Systematics, biogeography and paleontology, p.64-160.1990.

SOARES, M. R. M.; AZEVEDO, C. S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical vol.35 no.4. 2002.

SØRENSEN, H. P. & MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microb Cell Fact, v.4, n.1, Jan 4, p.1. 2005.

SOUZA, A. M.; REIS, J. K.; ASSIS, R. A.; HORTA, C.C.; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S. ALVARENGA, E. R.; CASTRO, C. S.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O.; PIRES, P. S.; CONTIGLI, C.; LOBATO, F. C.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. Genet Mol Res. Feb 18;9(1):266-76. 2010.

SRINIVASAN, K. N.; SIVARAJA, V.; HUYS, I.; SASAKI, T.; CHENG, B.; KUMAR, T. K.; SATO, K.; TYTGAT, J.; YU, C.; SAN, B. C.; RANGANATHAN, S.; BOWIE, H. J.; KINI, R. M. e GOPALAKRISHNAKONE, P. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. J Biol Chem, v.277, n.33, Aug 16, p.30040-7. 2002.

TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. Comp. Biochem. Physiol. C, 103(2), 299-302. 1992.

TEIXEIRA, C. E.; DE OLIVEIRA, J. F.; BARACAT, J. S.; PRIVIERO, F. B.; OKUYAMA, C. E.; RODRIGUES NETTO JR., N.; FREGONESI, A.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. Urology, 63(1), 184-189. 2004.

TEIXEIRA, C. E.; IFA. D. R.; CORSO, G.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Sequence and structure-activity relationship of a scorpion venom toxin with nitrenergic activity in rabbit corpus cavernosum. FASEB J. 2003 Mar;17(3):485-7. Epub Jan 22. 2003.

TOLEDO, D. & NEVES A. G. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. Comp Biochem Physiol B. 55(2):249-53. 1976.

TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B.; MARTINI, R. K.; BORGES, C. V. A. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. Rev. Saúde Pública. vol.36, n.5, pp. 631-633. ISSN 0034-8910. 2002.

TORRES-LARIOS, A.; GURROLA, G. B.; ZAMUDIO, F. Z.; POSSANI, L. D. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. Eur J Biochem, v.267, n.16, Aug, p.5023-31. 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

TYTGAT, J.; CHANDY, K. G.; GARCIA, M. L.; GUTMAN, G. A.; MARTIN- EAUCLAIRE, M. F.; VAN DER WALT, J. J.; POSSANI, L. D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. Trends Pharmacol. Sci., 20(11), 444-447. 1999.

TYTGAT, J.; DEBONT, T.; ROSTOLL, K.; MULLER, G. J.; VERDONCK, F.; DAENENS, P.; VAN DER WALT, J. J.; POSSANI, L. D. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. FEBS Lett, v.441, n.3, Dec 28, p.387-91. 1998.

VALDIVIA, H. H. & POSSANI, L. D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. TCM, v.8, n.3, p.111-118. 1998.

VALDIVIA, H. H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W. J.; CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}(2+)$ -release channel of skeletal and cardiac muscle. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.24, Dec 15, p.12185-9. 1992.

VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V. L.; BENDHACK, L. M.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C. Effects of voltage-gated Na^+ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. Comp. Biochem. Physiol., 141C(1), 85-92. 2005.

VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M. N.; LAUTNER, R. Q.; GOMES, E. R.; MATA-MACHADO, L. T.; MURARI, A.; ROCHA-RESENDE, C.; ELENA DE LIMA, M.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A.; PIMENTA, A. M. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. Toxicon. Dec 15;56(7):1162-71. Epub., Apr. 22. 2010.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; Silva, D. M. R.; IANZER, D.; Martin-Eauclaire, M.F; Bougis, P.E; de Lima, M.E.; Santos, R.A.S.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 371, p. 515-520, 2008.

WANG, C. G.; CAI, Z.; LU, W.; WU, J.; XU, Y.; SHI, Y.; CHI, C. W. A novel short-chain peptide BmKX from the Chinese scorpion *Buthus martensi Karsch*, sequencing, gene cloning and structure determination. Toxicon, v.45, n.3, Mar 1, p.309-19. 2005.

WANG, C. Y.; TAN, Z. Y.; CHEN, B.; ZHAO, Z. Q.; JI, Y. H. Antihyperalgesia effect of BmK IT2, a depressant insect-selective scorpion toxin in rat by peripheral administration. Brain Res Bull, v.53, n.3, Oct, p.335-8. 2000.

WARNICK, J. E.; ALBUQUERQUE, E. X.; DINIZ, C. R. Electrophysiological observations on the action of the purified scorpion venom, *Tityustoxin*, on nerve and skeletal muscle of the rat. J Pharmacol Exp Ther, v.198, n.1, Jul, p.155-67. 1976.

WERKMAN, T. R.; GUSTAFSON, T. A.; ROGOWSKI, R. S.; BLAUSTEIN, M. P.; ROGAWSKI, M. A. Tityustoxin- $\text{K}\alpha$, a structurally novel and highly potent K^+ channel peptide toxin, interacts with the α -dendrotoxin binding site on a cloned $\text{Kv}1.2$ K^+ channel. Mol. Pharmacol., 44(2), 430-436. 1993.

WRIGHT, R. P.; CHAN, T. K.; HONETSCHLAGER, L.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V. Enzymes and toxins of the scorpion venom *Palamneus gravimanus*. Toxicon, v.15, n.3, p.197-205. 1977.

WU, Y.; JI, Y. H.; SHI, Y. L. Sodium current in NG108-15 cell inhibited by scorpion toxin BmKAS-1 and restored by its specific monoclonal antibodies. J Nat Toxins, v.10, n.3, Aug, p.193-8. 2001.

XU, C. Q.; BRONE, B.; WICHER, D.; BOZKURT, O.; LU, W. Y.; HUYS, I.; HAN, Y. H.; TYTGAT, J.; VAN KERKHOVE, E.; CHI, C. W. BmBKTx1, a novel Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi Karsch*. J Biol Chem, v.279, n.33, Aug 13, p.34562-9. 2004.

XU, X.; CAO, Z.; SHENG, J.; WU, W.; LUO, F.; SHA, Y.; MAO, X.; LIU, H.; JIANG, D.; LI, W. Genomic sequence analysis and organization of BmKalphaTx11 and BmKalphaTx15 from *Buthus martensii Karsch*: molecular evolution of alpha-toxin genes. J Biochem Mol Biol, v.38, n.4, Jul 31, p.386-90. 2005.

XU, C. G.; FAN, X. J.; FU, Y. J.; LIANG, A. H. Effect of location of the His-tag on the production of soluble and functional *Buthus martensii Karsch* insect toxin. Protein Expr Purif. 59(1):103-9. Epub. 2008.

YAMAZAKI, K.; YAHATA, H.; KOBAYASHI, N.; MAKIOKA, T. Egg maturation and parthenogenetic recovery of diploidy in the scorpion *Liocheles australasiae* (Fabricius) (Scorpions, ischnuridae). J Morphol. 247(1):39-50. 2001.

ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. IUBMB Life, v.57, n.1, Jan, p.13-21. 2005.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; PENG, F.; ZHU, Z. H. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. IUBMB Life, v.49, n.3, Mar, p.207-10. 2000. b.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; ZHU, S. Y.; PENG, F.; ZHU, Z. H.; WU, K. L.; YIANG, F. H. Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of a chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. Toxicon, v.38, n.8, Aug, p.1009-14. 2000. a.

ZENG, X. C.; WANG, S. X.; ZHU, Y.; ZHU, S. Y.; LI, W. X. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii Karsch*. Peptides, v.25, n.2, Feb, p.143-50. 2004.

ZENG, X. C.; ZHU, Z. H.; LI, W. X.; ZHU, S. Y.; PENG, F.; MAO, X.; LIU, H. Molecular cloning and genomic organization of a K(+) channel toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. Toxicon, v.39, n.2-3, Feb-Mar, p.407-10. 2001.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M.; WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. Toxicon, v.47, n.3, Mar, p.348-55. 2006.

ZHU, S.; LI, W.; ZENG, X.; JIANG, D.; MAO, X.; LIU, H. Molecular cloning and sequencing of two 'short chain' and two 'long chain' K(+) channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. FEBS Lett, v.457, n.3, Sep 3, p.509-14. 1999.

ZLOTKIN, E. Chemistry and pharmacology of buthinae scorpion venoms. In: S. Bettini (Ed.). Arthropd Venoms, p.317-369. 1978.