

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Imunoquímica de toxinas
escorpiônicas que afetam canais para
sódio: mapeamento de epitopos
descontínuos**

CLARA GUERRA DUARTE

BELO HORIZONTE

AGOSTO DE 2011

CLARA GUERRA DUARTE

**Imunoquímica de toxinas
escorpiônicas que afetam canais para
sódio: mapeamento de epitopos
descontínuos**

Tese de doutorado apresentada ao
programa de pos-graduação em Bioquímica e
Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais
(UFMG)

ORIENTADOR: DR. CARLOS CHAVEZ OLÓRTEGUI

BELO HORIZONTE

AGOSTO DE 2011

Este trabalho foi realizado:

no Laboratório de Imuniquímica de Proteínas, ICB, UFMG;
e no Laboratório SysDiag – UMR 3145 – Montpellier, França

E, contou com o apoio financeiro do:

Departamento de Bioquímica e Imunologia- ICB- UFMG;

CNPq;

Programa CAPES-COFECUB

CNRS

FAPEMIG.

CAPES-REUNI

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família, aos meus companheiros de bancada e a meus mestres, que me inspiram a prosseguir sempre.

*“Já de saída a minha estrada entortou
Mas vou até o fim”*

(Chico Buarque)

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao fim desta estrada, gostaria de agradecer àqueles que tornaram o caminho possível:

Em primeiro lugar, ao meu orientador Prof. Carlos Chavez, amigo e pai científico, pelos ensinamentos e oportunidades, pelo exemplo, pelo entusiasmo e inspiração, pela compreensão e confiança, a minha gratidão por toda vida!

Ao Prof. Tomaz, pela sabedoria compartilhada. Obrigada por todos os ensinamentos e por me fazer a Imunologia com outros olhos.

À Dra. Larissa Alvarenga, meu maior exemplo, pelas parcerias e discussões e pela eterna ajuda e consultoria. Obrigada pela generosidade!

À Dra. Liza Felicori e à Camila Dias Lopes, além da correção desta tese, pela convivência e amizade. Obrigada por me inspirarem e me ajudarem a ser uma cientista melhor a cada dia!

Ao Dr. Ricardo Andrez, por toda a ajuda com a espectrometria de massas e modelagem molecular e por ser meu companheiro no mundo dos escorpiões, sempre presente!

À Fernanda Costal e Maria Clara Starling, por também me ensinarem muito, mesmo que seja eu a doutoranda e elas as ICs. Obrigada pela confiança e disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas: Betânia, Carol, Dayse, Chris, Chico, Gabi, Réssica, Karen, Mariana, Stephanie, Thaisinha, Luís; pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar. A rotina no laboratório é muito mais agradável com vocês.

Aos que já passaram pelo laboratório e deixaram saudades: Júlia, Marco Túlio, Paulex, Eric, Diogo, Lulu, Fabíola, Priscila, Áquila, Isabelle, Melina, Mário... Obrigada por também terem contribuído para a minha formação.

Ao Dr. Claude Granier, por ter me recebido em Montpellier e me ensinado realmente como fazer Ciência. Obrigada por ter me concedido a oportunidade de aprender tanto!

Ao Dr. Frank Molina, por me ensinar a enxergar mais longe.

À Dra Violaine Moreau, por permitir o uso de seu programa, por estar sempre perto, ainda que distante. Obrigada pela confiança!

Ao Laboratório Sysdiag em Montpellier, por terem me acolhido: Christophe, Jean-Daniel, Jeanette, Dung, Daniel, Sylvie, Benedicte, David, Lionel, Delphine, Eric, Dominique, Priscilla, Isabelle, Eve, Veronique, Sophie, Laurance, Nicolas, Pierre-Marie, Alain, Florant, Randa. Em especial, agradeço a Plateforme d'anticorps: Pascale, Sandra, Aurelie, Emilie e Bertrand, por todos os ensinamentos acerca dos anticorpos monoclonais; e à Sabine, Stephanie e Cécile, pela amizade que ficou.

À Dra. Marie-France Martin-Eauclaire e a todos da Faculté de Médecine, na Université de la Méditerranée, em Marseille, em especial ao Prof. Miranda, pela colaboração, pela acolhida, pelas discussões e correções e pela convivência, ainda que breve. Foi uma honra conhecê-los!

Aos colegas de Bases e do departamento, por todos os reagentes e aparelhos emprestados e discussões produtivas.

Ao Dr. Evanguedes Kalapothakis e ao Anderson de Oliveira do Carmo, do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, por terem cedido a amostra de soro anti-Ts3rec e pelo apoio.

À Pollyana, Celise e Grazielle, por toda a ajuda administrativa, sempre com muita boa vontade.

À minha família, por torcer sempre e acreditar em mim mais do que eu mesma.

Ao Felipe, pela compreensão e amor.

Ao Núcleo Artístico, por ser a minha válvula de escape.

Ao Pedro Jet, pela ajuda com o Word.

Aos amigos queridos, por estarem sempre por perto.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VII
QUADRO DE AMINOÁCIDOS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	- 1 -
1. INTRODUÇÃO	- 2 -
1.1 Imunoquímica.....	- 5 -
1.1.1. Interação Antígeno-Anticorpo.....	- 5 -
1.1.2. Antigenicidade x Immunogenicidade.....	- 7 -
1.1.3. Epitopos: Contínuos e Descontínuos.....	- 8 -
1.1.4. Mapeamento de Epitopos.....	- 10 -
1.2. Escorpionismo.....	- 13 -
1.2.1. Epidemiologia	- 14 -
1.2.2. O veneno.....	- 19 -
1.2.3. Sintomatologia do Envenenamento	- 24 -
1.2.4. Tratamento.....	- 25 -
1.2.5. Produção do Soro Anti-escorpiônico.....	- 29 -
1.2.6. Aplicações Biotecnológicas do Veneno de Escorpião.....	- 33 -
1.3. Toxinas estudadas.....	- 34 -
1.3.1. TsNTxP (“Ts4”)	- 35 -
1.3.2. Amm8.....	- 38 -
1.3.3. AaH2.....	- 40 -
1.3.4. Ts3.....	- 43 -
2. OBJETIVOS	- 48 -
2.1. Geral.....	- 48 -
2.2. Específicos.....	- 48 -
3. MATERIAIS E MÉTODOS	- 51 -
3.1. Proteínas escorpiônicas mapeadas	- 51 -
3.2. Purificação da Ts3	- 51 -
3.2.1. <i>Gel Filtração em Coluna Sephadex G50</i>	- 51 -
3.2.2. <i>Fase Reversa em Coluna C18</i>	- 52 -
3.3. Predição de epitopos conformacionais	- 52 -
3.3.1. <i>Diepitopos</i>	- 52 -

3.3.2. <i>Bioinformática</i>	- 52 -
3.4. Validação da predição de epitopos conformacionais por SPOT synthesis	- 55 -
3.4.1. <i>Síntese paralela dos peptídeos preditos</i>	- 55 -
3.4.2. <i>Imunoensaio</i>	- 57 -
3.4.3. <i>Revelação</i>	- 58 -
3.4.4. <i>Quantificação</i>	- 58 -
3.4.5. <i>Regeneração da membrana</i>	- 59 -
3.5. <i>ALA-Scan</i>	- 59 -
3.6. Síntese química dos epitopos identificados	- 59 -
3.7. Acoplamento de peptídeos á proteínas imunogênicas	- 60 -
3.7.1. <i>Via glutaraldeído</i>	- 60 -
3.7.2. <i>Via SMCC</i>	- 61 -
3.8. Lipossomos.....	- 61 -
3.9. Imunizações	- 62 -
3.10. ELISA	- 62 -
3.10.1. <i>ELISA direta</i>	- 62 -
3.10.2. <i>ELISA de competição</i>	- 63 -
3.11. Ensaio de neutralização	- 63 -
3.11.1. <i>In vivo</i>	- 63 -
3.11.2. <i>In vitro</i>	- 64 -
3.12. Análises Computacionais	- 64 -
3.12. Purificação de IgG em coluna de proteína A	- 64 -
4. RESULTADOS	- 66 -
4.1. TsNTxP	- 66 -
4.2. Amm8.....	- 81 -
4.3. AaH2.....	- 93 -
4.4. Ts3.....	- 105 -
5. DISCUSSÃO.....	- 123 -
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	- 142 -
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 145 -
8. ANEXOS.....	- 166 -
8.1. ARTIGOS PUBLICADOS	- 166 -
8.2. Outros trabalhos gerados durante a realização desta tese.....	- 167 -

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura da imunoglobulina e seu sítio de interação.</i>	- 6 -
<i>Figura 2: Definição de epítopos contínuos e descontínuos.</i>	- 9 -
<i>Figura 3: Distribuição do escorpionismo no mundo.</i>	- 14 -
<i>Figura 4: Incidência de acidentes com animais peçonhentos no Brasil nos últimos 10 anos.</i> -	17 -
<i>Figura 5: Principais espécies causadoras de acidentes escorpiônicos no Brasil.</i>	- 17 -
<i>Figura 6: Incidência de acidentes escorpiônicos em 2010, por unidade federativa.</i>	- 19 -
<i>Figura 7: Desenho esquemático da estrutura de um canal para sódio.</i>	- 23 -
<i>Figura 8: Marcos no desenvolvimento de antivenenos.</i> Acima da linha do tempo são mostrados os marcos do desenvolvimento dos antivenenos e abaixo da linha estão destacados os avanços da ciência que permitiram tal desenvolvimento. (retirado de ESPINHO-SOLIS ET AL.,2009)	- 29 -
<i>Figura 9: Sequência primária da TsNTxP.</i>	- 35 -
<i>Figura 10: Sequência primária da Amm8.</i>	- 39 -
<i>Figura 11: Estrutura tridimensional modelada das toxinas Amm5, Amm8 e AaH2.</i>	- 40 -
<i>Figura 12: Sequência primária da AaH2.</i>	- 41 -
<i>Figura 13: Estrutura tridimensional resolvida da AaH2 (PDB: 1AHO).</i>	- 41 -
<i>Figura 14: Sequência primária da Ts3.</i>	- 44 -
<i>Figura 15: Exemplo de alfabeto estrutural.</i>	- 54 -
<i>Figura 16: Reatividade dos diepitopos preparados pela técnica de SPOT.</i>	- 66 -
<i>Figura 17: Reatividade, medida por ELISA, do diepitopo com soros de coelho anti-Ts, anti-TsNTxP e pré-imune.</i>	- 69 -
<i>Figura 18: Reatividade, medida por ELISA, do imunógeno OVA-diepitopo com o soro de coelho anti-TsNTxP.</i>	- 69 -
<i>Figura 19: Resposta, medida por ELISA, dos camundongos individuais à imunização com OVA-Diepitopo.</i>	- 70 -

<i>Figura 20: Reatividade, medida por ELISA, dos pools de soro de camundongos imunizados com OVA-Diepitopo ou controle.</i>	<i>- 71 -</i>
<i>Figura 21: Reatividade, medida por ELISA, do soro de camundongo anti-OVA-Diepitopo frente à fração tóxica do veneno de T.serrulatus (TsFG50).</i>	<i>- 71 -</i>
<i>Figura 22: Alinhamento da sequência da TsNTxP com as principais toxinas de T.serrulatus.</i>	<i>- 73 -</i>
<i>Figura 23: Localização espacial do diepitopo na superfície da TsNtXP e das toxinas relacionadas de T.serrulatus.</i>	<i>- 73 -</i>
<i>Figura 24: Predição da imunogenicidade da TsNTxP feita por EPITOPIA.</i>	<i>- 74 -</i>
<i>Figura 25: Modelo da sobreposição do diepitopo na estrutura da TsNTxP e as medidas do mesmo para o reconhecimento do sítio por anticorpos.</i>	<i>- 75 -</i>
<i>Figura 26: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do diepitopo, testada com o soro dos camundongos imunizados.</i>	<i>- 76 -</i>
<i>Figura 27: Reatividade, testada por ELISA, do soro de coelho anti-OVA-diepitopo.</i>	<i>- 77 -</i>
<i>Figura 28 : Reatividade dos diepitopos preparados pela técnica de SPOT com soro de coelho anti-OVA-diepitopo.</i>	<i>- 79 -</i>
<i>Figura 29: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do diepitopo, testada com o soro dos coelhos imunizados.</i>	<i>- 80 -</i>
<i>Figura 30: Reatividade de anticorpos policlonais contra peptídeos lineares sobrepostos das sequências da Amm8 e da AaH2, preparados pelo método de SPOT.</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Figura 31: Segmentos e grupos identificados na estrutura do modelo da Amm8 pelo algoritmo PEPOP.</i>	<i>- 84 -</i>
<i>Figura 32: Reatividade de anticorpos policlonais anti-Amm8 com peptídeos lineares sobrepostos das sequências da Amm8 e com peptídeos conformacionais preditos por PEPOP.</i>	<i>- 86 -</i>
<i>Figura 33: Regiões descontínuas antigênicas da Amm8, deduzidas a partir da localização dos segmentos reativos com os anticorpos policlonais de coelho anti-Amm8.</i>	<i>- 88 -</i>

<i>Figura 34: Reatividade de anticorpos policlonais anti-Amm8 com peptídeos lineares sobrepostos das sequências da AaH2 e com peptídeos conformacionais preditos por PEPOP-</i>	89
<i>-Figura 35: Localização dos peptídeos reativos por SPOT, localizados na estrutura 3D da AaH2 (PBD: 1AHO).</i>	91
<i>Figura 36: Reatividade, medida por ELISA, do soro de camundongos C57BL/6 imunizados com os peptídeos da AaH2 reativos por SPOT com anticorpos policlonais anti-Amm8.</i>	92
<i>Figura 37: Reatividade do anticorpo monoclonal anti-AaH2 4C1 com a membrana contendo 116 peptídeos derivados da estrutura da AaH2, a partir de predição feita por PEPOP</i>	97
<i>Figura 38: Localização espacial do peptídeo descontínuo identificado na superfície da estrutura tridimensional resolvida da AaH2.</i>	97
<i>Figura 39: Controle da reatividade da membrana conformacional AaH2, testada com outros anticorpos, seguindo o mesmo protocolo.</i>	98
<i>Figura 40: Controle da reatividade do anticorpo monoclonal 4C1, seguindo o mesmo protocolo.</i>	99
<i>Figura 41: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do peptídeo identificado, testada com mAb 4C1.</i>	100
<i>Figura 42: Gráfico de reatividade e membrana de controles do peptídeo descontínuo identificado, testada com o MAb 4C1.</i>	101
<i>Figura 43: ELISA de competição do MAb 4C1 com o peptídeo descontínuo.</i>	103
<i>Figura 44: ELISA do soros de camundongos imunizados com o peptídeo descontínuo identificado, produzidos segundo diferentes metodologias..</i>	104
<i>Figura 45: Predição da imunogenicidade da AaH2 feita por EPITOPIA.</i>	105
<i>Figura 46: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com soro de coelho pré-imune.</i>	109
<i>Figura 47: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com soro de coelho anti-veneno total de T.serrulatus.</i>	109

<i>Figura 48: Purificação da Ts3 a partir do veneno bruto de T.serrulatus.</i>	<i>- 111 -</i>
<i>Figura 49: Resposta, medida por ELISA, dos grupos de camundongos à imunização com Ts3 purificada, em adjuvante de Freund.</i>	<i>- 112 -</i>
<i>Figura 50: ELISA do soro e ascite dos animais imunizados com Ts3.</i>	<i>- 113 -</i>
<i>Figura 51: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com IgG de camundongo anti-Ts3.</i>	<i>- 114 -</i>
<i>Figura 52: Gráfico da proporção de segmentos presentes nos peptídeos totais preditos para a Ts3, nos SPOTs reativos com cada anticorpo.</i>	<i>- 118 -</i>
<i>Figura 53: Gráfico demonstrando os valores de ponto isoelétrico para os peptídeos preditos para a Ts3.</i>	<i>- 118 -</i>
<i>Figura 54: Localização espacial dos segmentos reativos identificados na superfície do modelo tridimensional da Ts3.</i>	<i>- 119 -</i>
<i>Figura 55: Predição da imunogenicidade da Ts3 feita por EPITOPIA.</i>	<i>- 119 -</i>
<i>Figura 56: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com soro de coelho anti-Ts3rec.</i>	<i>- 120 -</i>
<i>Figura 57: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos sobrepostos derivados da sequência linear da Ts3 com diferentes soros.</i>	<i>- 121 -</i>
<i>Figura 58: Gráfico da hidrofobicidade, segundo Hopp & Woods, do peptídeo descontínuo identificado através de PEPOP para a AaH2.</i>	<i>- 136 -</i>
<i>Figura 59: Alinhamento das sequências das toxinas estudadas e dos epitopos descontínuos identificados.</i>	<i>- 142 -</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas mais frequentes nos acidentes escorpiônicos.....	- 25 -
Tabela 2: Sequências dos peptídeos derivados da TsNTxP, preparados por SPOT.....	- 67 -
Tabela 3: Lista das sequências dos spots que apresentaram maior reatividade frente ao soro de coelho anti-TsNTxP.....	- 68 -
Tabela 4: Experimento de proteção in vivo.	- 72 -
Tabela 5: Ensaio de neutralização in vitro de 3 DL50 de veneno de T.serrulatus.	- 78 -
Tabela 6: Ensaio de neutralização in vitro de 1 DL50 de veneno de T.serrulatus.....	- 78 -
Tabela 7: Lista das sequências dos spots que apresentaram maior reatividade frente ao soro de coelho anti-OVA-diepitopo.	- 80 -
Tabela 8: Segmentos acessíveis da Amm8, preditos e agrupados por PEPOP e sua posição na sequência linear da proteína.....	- 83 -
Tabela 9: Lista dos possíveis epítopos descontínuos da Amm8 preditos por PEPOP e sintetizados na membrana de SPOT.	- 85 -
Tabela 10: Lista dos epítopos descontínuos preditos a partir da AaH2, reativos com os anticorpos policlonais anti-Amm8 por SPOT.	- 90 -
Tabela 11: Desafio in vivo de camundongos C56BL/6 imunizados com peptídeos conjugados com a toxina AaH2.	- 93 -
Tabela 12: Segmentos acessíveis da AaH2, preditos e agrupados por PEPOP e sua posição na sequência linear da proteína.....	- 94 -
Tabela 13: Sequência de aminoácidos dos 116 peptídeos preditos por PEPOP a partir da estrutura 3D da AaH2.....	- 96 -
Tabela 14: Lista dos peptídeos controles do peptídeo descontínuo identificado, sintetizados em membrana de SPOT.....	- 101 -
Tabela 15: Segmentos acessíveis da Ts3, preditos e agrupados por PEPOP e sua posição na sequência linear da proteína.....	- 106 -

Tabela 16: Lista dos possíveis epitopo descontínuos da Ts3 preditos por PEPOP e sintetizados na membrana de SPOT.	- 108 -
Tabela 17: Lista dos peptídeos Ts3 preditos por PEPOP reativos com soro anti-veneno total de T.serrulatus.....	- 110 -
Tabela 18: Desafio in vivo de camundongos Balb/c imunizados com Ts3, com 2 DL50 do veneno total de T.serrulatus.	- 114 -
Tabela 19: Lista dos peptídeos Ts3 preditos por PEPOP reativos com IgG anti-Ts3.....	- 116 -
Tabela 20: Lista dos segmentos de Ts3 preditos por PEPOP que se mostraram mais reativos nos imunoensaios de SPOT.....	- 117 -

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AaH2	Toxina 2 de <i>Androctonus australis</i>
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
Amm8	Toxina 8 de <i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CBS	Tampão Acido Citrico, NaCl, KCl
cDNA	Acido Desoxirribonucléico complementar
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxide
ECL	Enhanced ChemioLuminescence
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fmoc	Fluorenil metil oxicarbonila
F-moc-βAla-OH	Beta alanina ligada a F-moc
HOBT	Hidroxibenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
IgG	Imunoglobulina G
KLH	<i>Keyhole limphet hemocyanin</i>
DL50	Dose letal para 50%
mAb	Anticorpo monoclonal
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MTT	Bromídio de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium
NaBH4	Borohidreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
OVA	Ovalbumina

PBS	Tampão salina fosfato
PDB	Protein Data Bank
pl	Ponto Isoelétrico
RIA	<i>Radioimmuno assay</i>
RPM	Rotações por minuto
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
scFV	Single chain variable fragment
Smcc	N-succinimidil-4-(maleimidometil) ciclohexano carboxilato
TBS	Tampão Tris, KCl, NaCl
Ts3	Toxina 3 de <i>Tityus serrulatus</i>
TsNTxP	Tityus serrulatus non-toxic protein
TFA	Acido Trifluoroacetico
U.V.	Ultra Violeta
WHO	World Health Organization

QUADRO DE AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação
Glicina	Gly, Gli	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys, Cis	C
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys, Lis	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp, Tri	W

RESUMO

Mesmo com um tratamento já bem estabelecido e antivenenos eficientes disponíveis no mercado, o envenenamento por escorpiões ainda constitui um grave problema de saúde pública mundial. Apesar da evolução na formulação dos antivenenos, pouco tem sido efetivamente feito para melhorar a etapa de produção inicial deste soro: a imunização do animal produtor. O estudo de imunógenos que sejam eficazes na geração de anticorpos neutralizantes e que não sejam tóxicos para o animal produtor seria, portanto, de grande interesse. A identificação de epitopos em um antígeno é importante para a caracterização de anticorpos, bem como para o entendimento das bases moleculares da antigenicidade e imunogenicidade, além de ter aplicação direta na manipulação deste antígeno para sua utilização como imunógeno. Este trabalho teve como finalidade mapear, através de técnicas que combinam abordagens bioinformáticas e experimentais, epitopos descontínuos de toxinas escorpiônicas de relevância médica e biotecnológica, como a AaH2 e a Ts3 , e de anatoxinas com potencial neutralizante, TsNTxP e Amm8. Foram identificados potenciais epitopos conformacionais nestas toxinas, utilizando-se anticorpos neutralizantes gerados a partir delas. Estes epitopos mapeados aparentemente se relacionam com a superfície bioativa determinada para a família das α -toxinas que afetam canais para sódio escorpiônicas, justificando seu potencial neutralizante. A identificação de tais epitopos contribui para um melhor entendimento da imunquímica das toxinas e pode auxiliar no desenvolvimento de imunógenos para a criação de uma nova geração de imunoterápicos, mais específicos, seguros e eficazes para o tratamento dos acidentes escorpiônicos.

PALAVRAS-CHAVE: escorpião, antiveneno, mapeamento, epitopos descontínuos

ABSTRACT

Scorpionism is still a worldwide health problem, even though there is a well established treatment and good quality antivenoms available. Despite the evolution in the preparation of antivenoms, the first step in this process, the immunization of animals, has not followed this development. The study of immunogens that are capable of eliciting neutralizing antibodies but that are not toxic for the producer animal would be of great interest. The identification of epitopes within an antigen is important for the characterization of antibodies, as well as for the general understanding of the molecular basis of antigenicity and immunogenicity, and can be directly applied in the manipulation of the antigen to be used as an immunogen. The main goal of this work was to map, through a combined approach of bioinformatics and experimentation, discontinuous epitopes in scorpion toxins of medical and biotechnological interest, as AaH2 and Ts3, and anatoxins with neutralizing potential, TsNTxP and Amm8. Putative discontinuous epitopes were identified, using neutralizing antibodies generated by immunization with these proteins. The mapped epitopes apparently relate to the bioactive surface determined for the family of α -toxins for voltage gated sodium channels, possibly accounting for its neutralizing potential. The identification of such epitopes contributes for a better understanding of the immunochemistry of toxins and can help the development of new immunogens and creation of a new generation of immune products with improved specificity, safety and efficiency for the treatment of scorpion stings.

KEY-WORDS: scorpion, antivenoms, epitope mapping, discontinuous epitopes

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Imunoquímica pode ser definida como o estudo dos fenômenos imunológicos e das reações desencadeadas pela estimulação antigênica do sistema imune, a partir do ponto de vista químico, segundo definição do MeSH, (Medical Subject Headings – PubMed). Apesar da definição de Imunoquímica abranger todos os processos de reconhecimento de antígenos e resposta do sistema imune através de linfócitos B e T, os estudos imunoquímicos, ao longo do tempo, têm sido principalmente focados no estudo da interação físico-química entre antígenos e anticorpos (MOSBY, 2009).

A função biológica dos anticorpos é se ligar a patógenos e outras moléculas exógenas potencialmente nocivas ao organismo, para neutralizá-las e removê-las da circulação. Os anticorpos geralmente se ligam à apenas uma pequena região na superfície de moléculas maiores, como proteínas ou polissacarídeos. A esta pequena região dá-se o nome de epítopo (JANEWAY ET AL., 2001).

Epítopos podem ser segmentos contínuos na sequência primária da proteína, os chamados epítopos lineares ou contínuos, ou serem compostos por uma região na superfície tridimensional da proteína, composta por aminoácidos distantes na cadeia polipeptídica, os chamados epítopos conformacionais ou descontínuos (VAN REGENMORTEL, 2009). A identificação dos epítopos de uma dada molécula é chamada de mapeamento e pode ser feita através de diversas técnicas, como cristalografia do complexo antígeno-anticorpo, mutação sítio dirigida e imunoenaios peptídicos.

Por sua propriedade de neutralizar e remover antígenos da circulação, os anticorpos têm sido amplamente utilizados como medicamento para o tratamento de diversas patologias, como câncer (BRODY ET AL., 2011), infecção por patógenos (RAJAM ET AL., 2010), tratamento para rejeição de transplantes (SCHROEDER ET AL., 2010) e envenenamentos por animais peçonhentos (NEWCOMBE & NEWCOMBE, 2007). Os anticorpos podem ser utilizados na imunoterapia tanto como uma preparação monoclonal, contendo apenas um idiótipo de especificidade e afinidade definidas e direcionado a um epítopo específico; ou policlonal, contendo moléculas de diferentes afinidades e especificidades e direcionado a diferentes alvos no antígeno de interesse.

Nos casos de envenenamento com animais peçonhentos como serpentes e escorpiões, a imunoterapia com soro policlonal produzido em animais hiperimunizados, o chamado antiveneno, é o único tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Ainda há discussões acerca da sua utilização como tratamento único, principalmente no caso do antiveneno escorpiônico, e não há na literatura um estudo clínico randomizado definitivo que comprove a sua eficácia. No entanto, há boas evidências de que o antiveneno, quando administrado por via intravenosa, é capaz de reduzir as concentrações séricas de veneno (KRIFI ET AL., 2001).

Nos últimos vinte anos, grandes avanços foram feitos e incorporados na produção dos antivenenos, dando origem a novos imunoterápicos. As imunoglobulinas podem ser consideradas proteínas modulares, com domínios definidos que exercem funções distintas. Assim, é possível processá-las na preparação do imunoterápico para que sejam utilizados apenas os fragmentos de interesse das imunoglobulinas (Fab, F(ab)2', recombinantes), contendo o sítio de ligação ao antígeno, e são capazes de exercer suas propriedades neutralizantes porém com menor risco de hipersensibilidade colateral causado por seus outros domínios efetores (DEVAUX ET AL., 2001), (SELISKO ET AL. 2004), (JUAREZ-GONZALES ET AL., 2005), (QUINTERO-HERNANDEZ ET AL., 2007).

Apesar da evolução dos antivenenos, no que diz respeito a sua formulação, pouco tem sido efetivamente aplicado para melhorar a etapa de produção inicial deste soro: a imunização do animal produtor (ESPINO-SOLIS ET AL., 2009). A imunização com o veneno bruto é capaz de gerar um soro adequado ao tratamento. Entretanto, devido à alta toxicidade deste imunógeno, o animal imunizado sofre com os sintomas do envenenamento, o que reduz a sua expectativa de vida e pode o levar a morte (CHIPPAUX & GOYFFON, 1998), (GAZARIAN ET AL. 2005). O estudo de imunógenos que sejam eficazes na geração de anticorpos neutralizantes, mas que não sejam tóxicos para o animal produtor seria de grande importância para produção de antivenenos.

Mesmo com um tratamento já bem estabelecido e antivenenos eficientes disponíveis no mercado, o envenenamento por escorpiões ainda constitui um grave problema de saúde pública mundial. A amplitude desta questão tem, contudo, sido negligenciada, uma vez que afeta principalmente países em desenvolvimento do ,

longe das principais autoridades políticas e médicas globais, que se instalam nos grandes centros urbanos, onde o grande impacto econômico e médico acarretado pelos envenenamentos não é sentido. Estima-se que ao menos 1,2 milhões de picadas de escorpião ocorram por ano, ocasionando pelo menos 3000 mortes no mundo (CHIPPAUX, 2009). Esse número, porém, é uma subestimativa, uma vez que grande parte dos casos não é registrada adequadamente ou nem chega a receber atendimento médico adequado, sendo tratados de maneira informal.

No Brasil, o número de acidentes escorpiônicos registrados pelo SINAN (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), aumentou mais de 200% nos últimos dez anos. Parte deste aumento deve-se a grande adaptação do *Tityus serrulatus*, principal espécie responsável pelos acidentes no Brasil, ao ambiente urbano, aumentando a convivência deste com a população e assim o risco de acidentes. A reprodução partenogenética dessa espécie também favorece a sua rápida disseminação (LOURENÇO ET. AL., 1996).

Este trabalho tem como finalidade mapear, através de diferentes técnicas, epitopos descontínuos de toxinas escorpiônicas de relevância médica e biotecnológica, como a AaH2 e a Ts3, e de anatoxinas com potencial neutralizante, TsNTxP e Amm8. A identificação de tais epitopos contribui para um melhor entendimento da imun química das toxinas e pode auxiliar no desenvolvimento de novos imunógenos para a criação de uma nova geração de imunoterápicos, mais específicos, seguros e eficazes para o tratamento dos acidentes escorpiônicos.

1.1 Imunoquímica

Conforme anteriormente exposto, a Imunoquímica é o campo da Ciência que se ocupa, principalmente, do estudo das propriedades químicas dos anticorpos e a sua utilização em imunoenaios.

Anticorpos podem ser definidos como proteínas, da família das γ -globulinas, que se ligam especificamente a uma substância, o antígeno. Cada anticorpo apresenta especificidade única, porém, apesar dessa variação, a estrutura geral do anticorpo é conservada, sendo conhecido como imunoglobulina (Ig) (EDELMAN, 1969). Eles são produzidos por plasmócitos, e são secretados na corrente sanguínea em resposta a estímulos ao sistema imune. A sua ligação a antígenos tem a capacidade de neutralizar patógenos e prepará-los para serem retirados da circulação por fagócitos (JANEWAY ET AL., 2001).

Desde a definição do termo “antikörper”, da teoria das cadeias laterais e da “bala mágica”, desenvolvida por Ehrlich, e da utilização terapêutica do soro equino imunizado com a toxina diftérica para o tratamento desta patologia por Bhering, lançando as bases da imunoterapia (MACNALTY, 1954), muito já foi feito no sentido de elucidar a relação entre estrutura e função dos anticorpos. Entretanto, este assunto está longe de estar esgotado e muitas questões, principalmente no que diz respeito às bases moleculares envolvidas na interação antígeno-anticorpo, ainda permanecem em aberto.

1.1.1. Interação Antígeno-Anticorpo

Os componentes do sistema imune, como os receptores de células T e os anticorpos, conseguem discriminar formas moleculares de estrutura extremamente próxima, evidenciando a existência de alta especificidade nas interações.

A interação de anticorpos com seus antígenos relacionados ocorrem através de regiões presentes nos domínios variáveis de suas cadeias leve e pesada. Nesses domínios, loops que apresentam hipervariabilidade de sequência interagem entre si e formam uma única região no topo da molécula, sendo este o seu sítio de reconhecimento e determinante da especificidade da molécula. A forma do sítio de

reconhecimento pode variar, dependendo do comprimento e sequência dos loops, formando sítios mais rasos ou profundos (JANEWAY ET AL., 2001).

A interação antígeno-anticorpo é complementar, com as cadeias laterais dos resíduos de um membro do par se encaixando em fendas formadas no outro, e vice-versa. Apesar disso, algumas dessas chamadas fendas, que constituem sítios de interação entre as moléculas, podem permanecer desocupados, sendo preenchidos ou não por moléculas de água. Esse fato explica a ligação de mais de um antígeno por um mesmo anticorpo, e a existência de anticorpos com afinidades diferentes para um mesmo antígeno. Essa variação se daria por uma melhor ou pior complementariedade entre as superfícies, preenchendo mais ou menos sítios de interação. A manipulação do antígeno ou do anticorpo para melhor preencher os espaços da interação pode, portanto, aumentar a afinidade de ligação (MARIUZZA, 1987).

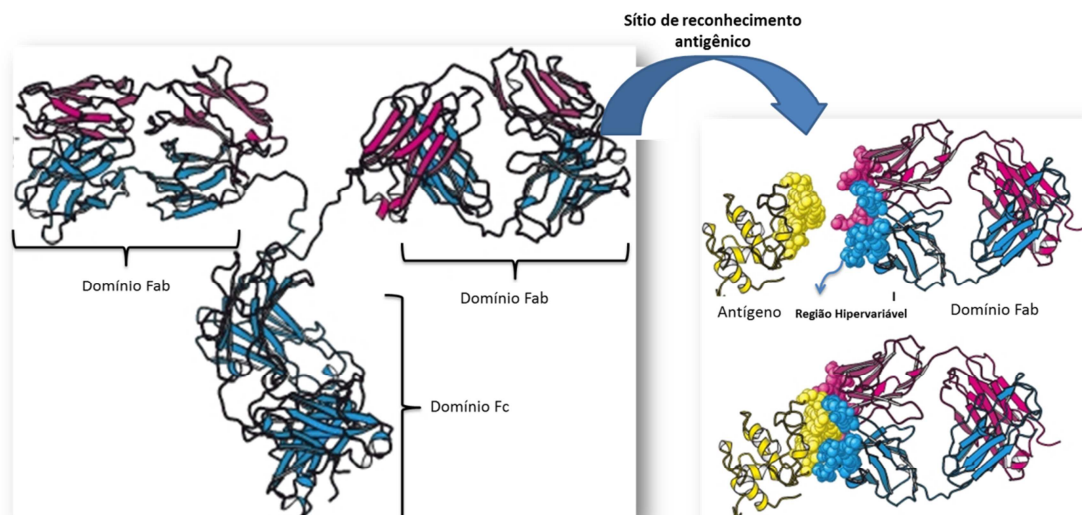


Figura 1: Estrutura da imunoglobulina e seu sítio de interação. As cadeias pesadas estão representadas em azul e as cadeias leves em rosa. Em destaque, o sítio de interação da porção Fab com antígeno protéico, em amarelo. Adaptado de STRYER ET AL.,2002.

A resolução por cristalografia de raio X de vários complexos antígeno-anticorpo tem auxiliado na determinação das características deste interação. O primeiro par que teve a sua estrutura estudada por cristalografia demonstrou que o sítio de interação do antígeno com o anticorpo é composto por cerca de 10 a 20 aminoácidos, o que foi confirmado por diversos estudos subseqüentes (AMIT ET AL.,1985); (AMIT ET AL., 1986);

(COLMAN ET AL., 1987); (SHERIFF ET AL., 1987); (TULIP ET AL., 1992). Porém, a análise posterior de 103 complexos revelou que, na maioria dos epitopos, somente poucos resíduos, cerca de 4 ou 5, são implicados na energia de ligação e determinam sua especificidade. Os outros resíduos desempenhariam um papel estrutural (GEYSEN ET AL., 1988). Verificou-se também que os antígenos tendem a estabelecer interações preferencialmente com os resíduos mais centrais dos loops que compõem a região hipervariável (MACCALLUM ET AL., 1996). Apesar da extrema variabilidade desta região, o sítio de ligação do anticorpo tende a ter caráter mais hidrofóbico que a maioria da superfície das proteínas, com uma alta incidência de resíduos de tirosina (BLYTHE E FLOWER, 2005).

Geralmente, os anticorpos são dirigidos contra regiões que se encontram expostas na superfície das proteínas. Resíduos que se encontram no interior do enovelamento do antígeno podem participar da ligação se houver uma grande alteração conformacional do complexo mediante a ligação, situação pouco usual. Nas observações feitas até o momento, apenas pequenas alterações moleculares ocorrem quando da ligação do complexo, com pequenas rotações das cadeias laterais, e rearranjos de até 1,5 Å em seus loops. O processamento ou desnaturação do antígeno poderia, contudo, expor resíduos não presentes na superfície da molécula nativa (MARIUZZA ET AL., 1987).

A interação entre antígeno e anticorpo é mantida por forças fracas, como pontes de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas. O fato de essas forças terem baixa energia livre (<20 Kcal/mol), ao contrário da ligação covalente (>40 Kcal/mol), garante o fenômeno da especificidade antígeno-anticorpo, sendo necessário um somatório de forças para que a interação ocorra (MENDEL ET AL., 1996).

1.1.2. Antigenicidade x Immunogenicidade

O termo antígeno se refere a qualquer entidade que possa ser especificamente reconhecida por componentes do sistema imune (ARNON & VAN REGENMORTEL, 1992).

Já antigenicidade pode ser definida como a habilidade de um epitopo, região específica da molécula do antígeno, reagir com um anticorpo. A antigenicidade diz respeito a um fenômeno de reconhecimento molecular, não sendo uma característica

intrínseca da proteína, mas que existe apenas quando relacionada a um determinado anticorpo capaz de se ligar a ela. Assim como um anticorpo só pode ser definido quanto a sua especificidade quando ligado a um antígeno, a natureza epitópica de um grupo de aminoácidos numa proteína só pode ser reconhecida a partir de sua ligação com uma imunoglobulina. Assim, um epítipo não é uma característica intrínseca de uma proteína, mas uma entidade relacional que só existe quando analisada junto à parte do anticorpo que se liga a ele, o chamado paratopo complementar.

É importante que o conceito de antigenicidade seja distinguido do de imunogenicidade, que é a capacidade de um antígeno, ou parte dele, de induzir uma resposta imunológica em um hospedeiro vertebrado (VAN REGENMORTEL, 2009).

Assim, um dado epítipo, ao ser reconhecido por um anticorpo, pode ser considerado como antigênico para aquele determinado anticorpo. Porém, para atestar se um epítipo possui propriedades imunogênicas é necessário que este seja inoculado em um sistema vivo e a sua resposta imunológica, celular e/ou humoral, deve ser quantificada.

1.1.3. Epítipos: Contínuos e Descontínuos

Os epítipos de um determinado antígeno podem ser classificados quanto a sua estrutura como contínuos, também denominados lineares; ou descontínuos, também denominados conformacionais.

A classificação de um epítipo contínuo é dada a todo fragmento peptídico composto por sequência de resíduos contíguos na estrutura linear de uma proteína. Não necessariamente todos os resíduos de um epítipo linear participam diretamente da interação com o paratopo relacionado. Em um peptídeo de maior tamanho, vários pontos de contato são intercalados por aminoácido não relevantes para a interação (ARNON & VAN REGENMORTEL, 1992).

Os epítipos descontínuos consistem em resíduos ou pequenas sequências de aminoácidos que estão distantes na estrutura primária da proteína, mas se encontram aproximados na estrutura tridimensional. Quando uma proteína é desnaturada,

teoricamente, os anticorpos que reagem com epítopos descontínuos deixam de reconhecê-la, pois estes são dependentes de conformação. Experimentalmente, porém, cerca de 10% dos anticorpos dirigidos contra epítopos descontínuos reagem com fragmentos lineares (ARNON & VAN REGENMORTEL, 1992). Isso é explicado pelo fato de que alguns segmentos maiores podem compor um epítopo descontínuo, representando um fragmento contínuo dentro de uma estrutura maior descontínua.

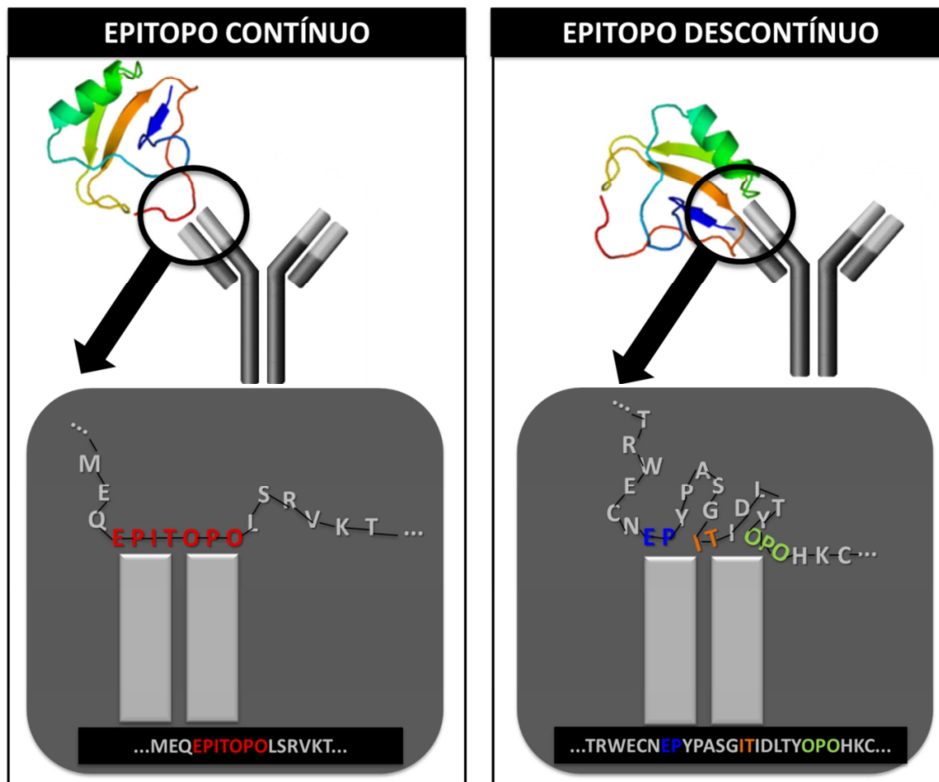


Figura 2: Definição de epítopos contínuos e descontínuos. Nos epítopos contínuos (esq.), uma série de aminoácidos contínuos na sequência primária da proteína são reconhecidos pelo paratopo do anticorpo. Nos epítopos descontínuos (dir.), aminoácidos que estão distantes na estrutura primária da proteína, mas que são aproximados no enovelamento são reconhecidos pelo paratopo do anticorpo.

Grande parte da resposta imune mediada por células B produz anticorpos que reconhecem as proteínas na sua forma solúvel, ou seja, que se ligam na superfície da sua conformação nativa, uma vez que o antígeno não sofre o processamento complexo pelo qual passam os antígenos apresentados às células T. Assim, especula-se que a maioria dos epítopos reconhecidos por anticorpos *in vivo* seja do tipo descontínuo.

1.1.4. Mapeamento de Epitopos

Algumas técnicas experimentais permitem a identificação de epitopos importantes em uma resposta imune, sendo o processo chamado mapeamento de epitopos (“*Epitope mapping*”). A identificação de epitopos em um dado antígeno é importante para a caracterização de anticorpos, bem como para entendimento das bases moleculares da antigenicidade e imunogenicidade, além de ter aplicação direta na manipulação deste antígeno para sua utilização como imunógeno.

A técnica que é capaz de mapear com maior exatidão um epitopo é a resolução da estrutura 3D do complexo antígeno-anticorpo que se deseja estudar por cristalografia ou ressonância nuclear magnética (MARIUZZA ET AL., 1987). Entretanto, esta é uma técnica bastante laboriosa e as condições adequadas podem não ser alcançadas para a produção de um cristal de qualidade. Surgiu assim a demanda por técnicas mais simples e rápidas para este fim.

A mutagênese sítio-dirigida é uma técnica que também pode ser utilizada para o mapeamento de epitopos. Esta técnica consiste em induzir a mutação de determinados aminoácidos que são potencialmente participantes do epitopo da molécula. Os mutantes expressos seriam então avaliados experimentalmente para verificar se o aminoácido alterado teria influência na ligação com o anticorpo. Caso a mutação prejudique significativamente a interação com o anticorpo, pode-se dizer que esses aminoácidos pertencem ao epitopo correspondente ou têm forte influência sobre ele (CARTER, 1986), (SZKLARZ ET AL., 1997). Entretanto, esta técnica também é trabalhosa, dependente de conhecimentos de Biologia Molecular e requer infraestrutura de alto custo laboratorial.

Dentre as metodologias alternativas propostas para o mapeamento de epitopos, podemos citar o método de SPOT (FRANK, 1992), (CARTER & LOOMIS-PRICE, 2004). Neste método, peptídeos que cobrem toda a sequência de aminoácidos de uma dada proteína são construídos paralelamente em membranas de celulose e testados quanto à sua reatividade com o respectivo anticorpo.

O método de SPOT foi criado partindo-se do pressuposto de que uma reação química pode proceder em uma região determinada de um suporte sólido, desde que os reagentes necessários estejam disponíveis nessa região em quantidades suficientes. Assim, quando uma pequena gota contendo um determinado reagente é depositada em uma membrana porosa, esta é absorvida e forma uma pequena região circular (spot). A adição de reagentes subsequentes nessa mesma região transforma-a em um reator. A técnica de síntese química de peptídeos desenvolvida por Merrifield em 1963 pode ser realizada neste formato.

Como uma mesma membrana pode abrigar diversos spots individualizados, sequências peptídicas diferentes podem ser sintetizadas em uma pequena área, sem que haja interação significativa entre elas. Para a detecção da reação ou interação de moléculas com as espécies imobilizadas na membrana, pode-se utilizar qualquer sistema colorimétrico ou de fluorescência já estabelecido para outras técnicas, como ELISA ou Western blot. Uma vez que um possível sinal positivo estará limitado ao sítio ou spot no qual a espécie reativa foi sintetizada, torna-se possível a sua identificação (FRANK 2002).

Esse é um método barato e conveniente que permite análise da reatividade de várias moléculas diferentes de forma simultânea. A técnica de SPOT já foi automatizada, permitindo a síntese eficiente de centenas de peptídeos em uma mesma membrana. Assim, é possível gerar dados em larga escala. Além disso, a técnica pode ser utilizada como ferramenta para o estudo de diversos eventos de interação molecular (DURAUER ET AL., 2006).

São poucas as técnicas desenvolvidas para a identificação de epitopos descontínuos, devido à inerente dificuldade de simular experimentalmente a conformação precisa dessas regiões (VAN REGENMORTEL & PELLEQUER, 1994). O SPOT, inicialmente, se prestou ao mapeamento de epitopos lineares, mas algumas modificações já foram propostas para permitir a identificação também de epitopos descontínuos (REINEKE ET AL., 1999). Espanel e colaboradores, em 2003, propuseram uma modificação da técnica que permite a análise de mais de um componente peptídico por SPOT, o chamado Double-Spot, que permite a identificação de interações que

dependem de mais de uma ligação de baixa afinidade atuando em conjunto para ser estabelecida.

Outra alternativa para o mapeamento de epitopos descontínuos é o método de *Phage Display* (PARMLEY & SMITH, 1989) que é uma técnica de seleção *in vitro* na qual ocorre a fusão gênica de sequências aleatórias que codificam uma proteína ou peptídeo a proteínas de superfície de um bacteriófago da classe M13, resultando na expressão de uma proteína heteróloga na superfície do capsídeo viral. A inserção de seqüências de nucleotídeos nos fagos é feita em uma região pré-determinada do genoma viral e permite a construção de uma biblioteca conformacional de peptídeos. Cada membro da biblioteca apresenta uma forma distinta de peptídeo e, portanto, diferentes capacidades de interação deste com a molécula alvo. Fagos, que apresentam em sua superfície peptídeos com especificidade de ligação desejada, podem ser selecionados da biblioteca através da ligação com uma molécula imobilizada (anticorpo) e a seqüência do peptídeo selecionado pode ser deduzida da seqüência do DNA encapsulado (SCOTT & SMITH, 1990). Esta técnica destaca-se na determinação de mimotopos ou epitopos conformacionais ou descontínuos, principalmente quando se utilizam anticorpos monoclonais cujo epitopo é, na maioria das vezes, conformacional (CORTESE ET AL., 1994).

Com o avanço e popularização da bioinformática, metodologias *in silico* também vêm surgindo para o auxílio da predição de epitopos. Nos últimos 25 anos, diferentes algoritmos foram desenvolvidos com o objetivo de prever epitopos de proteínas. Hoje, mais de 31 métodos de bioinformática são disponíveis para tais análises. A maioria destes métodos baseia-se em parâmetros como acessibilidade, hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade, antigenicidade, flexibilidade e estrutura secundárias. Somente em 2005 surgiram os primeiros métodos preditivos para epitopos conformacionais, que levam em conta a estrutura tridimensional das proteínas: CEP ("Conformational Epitope Prediction") (KULKARNI-KALE ET AL., 2005) e EMT ("Epitope Mapping Tool") (BATORI ET AL., 2006).

Mais recentemente, um método de bioinformática denominado PEPOP (MOREAU ET AL., 2008) baseado tanto na seqüência do antígeno, quanto na sua estrutura

tridimensional, foi desenvolvido. Este programa utiliza diferentes algoritmos com o objetivo de localizar regiões acessíveis na superfície das proteínas que poderiam corresponder a epitopos conformacionais.

O mapeamento de epitopos é peça fundamental para o entendimento da imunquímica de uma proteína, para que esta possa ser manipulada e encontre aplicações nas áreas médicas de tratamento e diagnóstico. No campo da Toxinologia em particular, este tipo de estudo é importante na medida em que auxilia na melhoria do tratamento através da imunoterapia já eficazes no caso de acidentes com animais peçonhentos.

1.2. Escorpionismo

Os escorpiões são considerados um dos animais que surgiram a mais tempo na evolução e que ainda são encontrados na natureza. Pela sua grande capacidade de adaptação, este aracnídeo habita a terra a mais de 400 milhões de anos, tendo sofrido muito poucas alterações na sua morfologia. Eles podem ser encontrados nos mais diversos habitats terrestres, como florestas tropicais, equatoriais e temperadas, savanas, cavernas e até mesmo montanhas (LOURENÇO, 2001).

O envenenamento por escorpiões é um problema de saúde pública que afeta diversas partes do globo, tendo grande prevalência em países em desenvolvimento do hemisfério Sul. A real incidência do escorpionismo é, entretanto, ainda desconhecida, uma vez que grande parte dos acidentados não procura os centros de saúde especializados para o atendimento. Estima-se o que o número de acidentes ultrapasse 1 milhão por ano, sendo a população rural a mais afetada.

Como os recursos médicos e econômicos são mais escassos nas regiões de maior incidência, o problema se torna ainda mais grave. Dessa maneira, os acidentes escorpiônicos são considerados como uma doença negligenciada, mesmo dentro do grupo de doenças negligenciadas já estabelecido pela OMS, e merece mais atenção (WHO, 2007).

1.2.1. Epidemiologia

1.2.1.1. No mundo

A epidemiologia do escorpionismo foi recentemente revisada por Chippaux & Goyffon, em 2007, através da análise de dados disponíveis em artigos científicos indexados no Medline, mapeando as principais regiões endêmicas. As regiões que apresentaram o maior número de fatalidades por ano foram o Norte da África, Oriente Médio e parte da Índia, México, Venezuela, parte da Colômbia e o Sudeste do Brasil. O número de espécies presentes nestas regiões não é elevado, porém a sua distribuição cobre grandes áreas geográficas.

Dos países desenvolvidos, apenas os estados do Sul dos Estados Unidos e a região mediterrânea da Europa possuem uma incidência relativamente importante de escorpionismo. Nos EUA, *Centruroides sculpturatus* responde pelos acidentes que ocorrem no Texas e Arizona, enquanto *Buthus occitanus* é a mais prevalente no Sul da Europa. Os acidentes graves não são frequentes.

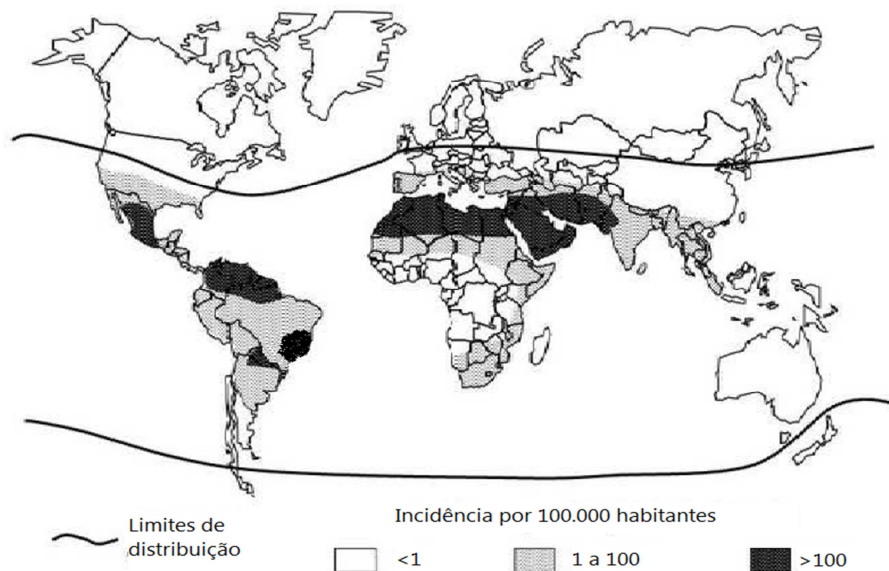


Figura 3: Distribuição do escorpionismo no mundo. Adaptado de Chippaux & Goyffon, 2007.

2007.

Na região do Mahgreb, porção Oeste do Norte da África que compreende o Marrocos, Argélia Tunísia e Líbia, dados epidemiológicos indicam a incidência de mais de 100.000 casos por ano. As principais espécies responsáveis pela maior parte dos acidentes são *Androctonus mauretanicus mauretanicus* no Marrocos (GHALIM ET AL., 2000) e *Androctonus australis* na Argélia (HAMMOUDI-TRIKI ET AL., 2004) e Tunísia (KRIFI ET AL., 1998). *Buthus occitanus tunetanus*, apesar de possuir um veneno menos tóxico para mamíferos do que as espécies supracitadas, tem distribuição ampla nesta área, sendo também responsável por alguns casos graves de envenenamento (MARTIN-EAUCLAIRE ET AL., 2006). Na região do Oriente Médio e Egito, *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* é o responsável pelo maior número de acidentes. Na Turquia (ADIGUZEL ET AL., 2007), a principal espécie causadora de acidentes é *Androctonus crassicauda*.

Na região da Índia, o escorpião vermelho, *Mesobuthus tamulus*, é o responsável pelos acidentes. O antiveneno produzido contra o veneno deste escorpião não parece ser muito eficaz. O tratamento do seu envenenamento é feito a base do bloqueador adrenérgico Prazozina. O uso deste medicamento parece ter diminuído os índices de mortalidade a menos de 1%, apesar de um número aparentemente alto de acidentes (BAWASKAR, 2005).

Na América do Norte, o México é um dos países mais acometidos pelo escorpionismo, contando com várias espécies do gênero *Centruroides* de importância médica. Devido à adoção de políticas públicas específicas e a disponibilização de antiveneno de alta qualidade, o quadro crítico de envenenamentos no México vem sendo dramaticamente revertido ao longo dos anos, passando de uma mortalidade de até 300 óbitos por ano, no período de 1985 a 1990 a índices quase nulos (POSSANI, 2000).

Na América do Sul, além do Brasil, Venezuela e Colômbia são os países mais acometidos. A Venezuela conta com mais de 11 espécies do gênero *Tityus*, potencialmente perigosas para o homem, sendo notificadas em acidentes (BORGES ET AL., 2010). Cada veneno dessas espécies diferentes apresenta toxicidade e antigenicidade distintos, sendo o desenvolvimento de um antiveneno adequado ainda um desafio para o país (BORGES ET AL., 2006), (BORGES ET AL., 2007). Na Colômbia, *Tityus pachyurus* é o

principal causador de envenenamentos (BARONA ET AL., 2006), apresentando toxicidade moderada.

Na Argentina, a adaptação do escorpião *Tityus trivittatus* tem sido responsável por um aumento considerável no número de acidentes reportados, com um incremento considerável na mortalidade. Acidentes também passaram a ser reportados em províncias onde nunca houvera notificações anteriormente (ROODT ET AL., 2010).

Os escorpiões não são espécies migratórias, tendo seu território restrito á algumas centenas de metros quadrados. Entretanto, pela ação antrópica e modificação de seu habitat natural, estes podem se dispersar e colonizar novos ambientes, alterando assim o padrão epidemiológico observado atualmente. Além disso, acidentes em regiões não endêmicas, causados por animais pertencentes a colecionadores ou acidentalmente transportados de uma região endêmica são existentes, porém não quantificados. Com a globalização crescente, esta é uma situação que tende a ocorrer com mais frequência e deve ser monitorada . (CHIPPAUX, 2009).

1.2.1.1. No Brasil

No Brasil, os acidentes escorpiônicos são os que possuem o maior número de notificações dentre os acidentes com animais peçonhentos. Em 2010, foram notificados 50.126 acidentes, dos quais 88 evoluíram para o óbito, sendo a incidência de 26,3 acidentes/100.000 habitantes e a letalidade de 0,2 % neste período. Crianças entre 1 e 9 anos representaram 44% dos óbitos relatados. Os acidentes ocorrem com mais frequência no período quente e chuvoso (outubro-março). A região com maior número de acidentes é a Nordeste (23.929), mas o estado onde ocorrem mais registros é Minas Gerais (12.016), seguido da Bahia (8.910) e São Paulo (6.790), para o período analisado de 2010.

Os principais agentes responsáveis pelos acidentes escorpiônicos são as espécies *Tityus serrulatus*, com ampla distribuição pelo país, exceto no Norte, sendo a espécie causadora de acidentes com maior gravidade; *Tityus bahiensis*, encontrado na

Bahia, Centro-Oeste, Sudeste e Sul; *Tityus stigmurus*, presente principalmente no Nordeste. Em menor proporção *Tityus paraensis* (recentemente renomeado a *Tityus obscurus*) é encontrado no Norte e Mato Grosso e *Tityus metuendus*, endêmico da região da Amazônia. Estes escorpiões adaptam-se facilmente aos grandes centros urbanos, fato evidenciado por 62,2% dos acidentes ocorrendo na zona urbana, e pela ocorrência de notificações em praticamente todas as capitais do país.

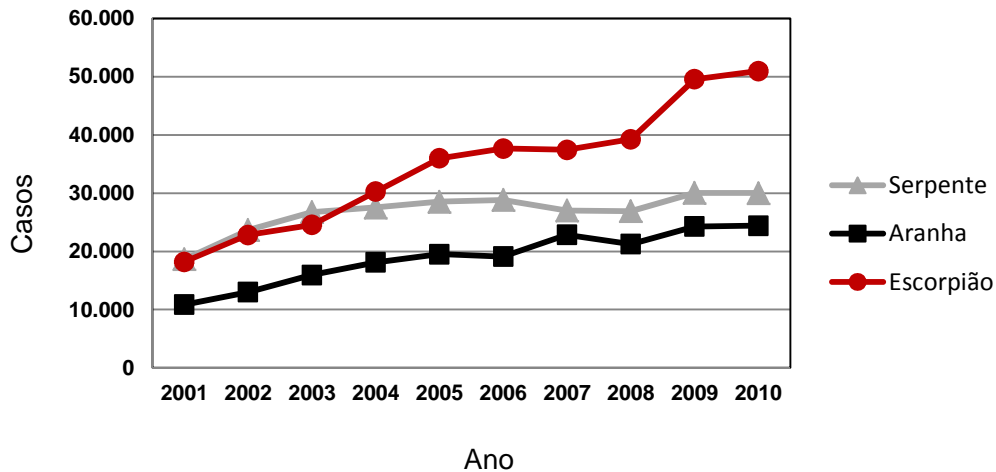


Figura 4: Incidência de acidentes com animais peçonhentos no Brasil nos últimos 10 anos. Tabulados a partir de dados disponibilizados pelo SINAN, do Ministério da Saúde.

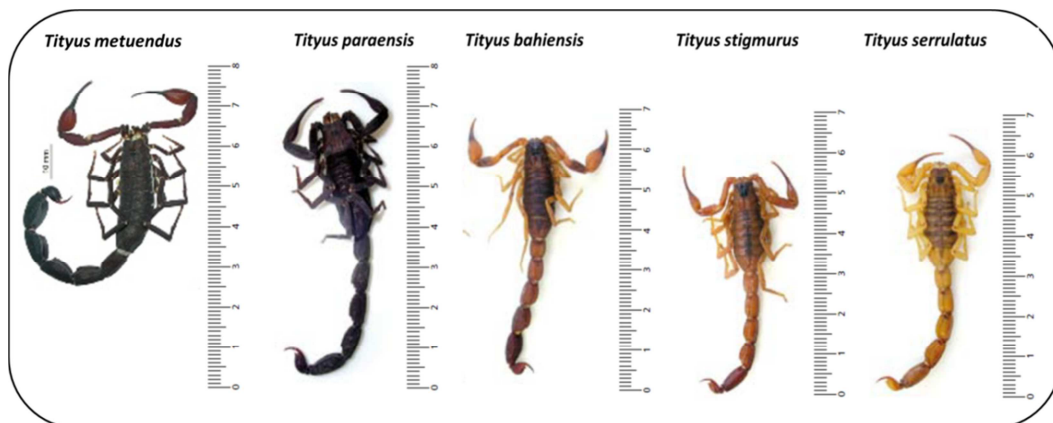


Figura 5: Principais espécies causadoras de acidentes escorpiônicos no Brasil. Adaptado do website do Ministério da Saúde.

No período de 2000-2010, número de envenenamentos registrados no Brasil aumentou mais que o dobro. O crescimento demográfico e uma melhora no registro dos dados epidemiológicos podem explicar parte do aumento da incidência do escorpionismo verificado. Entretanto, o crescimento urbano, com loteamentos colonizando novas áreas anteriormente não ocupadas pelo homem, pode contribuir também para este fato, pois favorece a expansão do escorpião *Tityus serrulatus*, principal espécie presente na região que, além de possuir reprodução partenogenética, apresenta hábitos domésticos e se adapta muito bem ao ambiente urbano, com o agravante de ser uma das espécies mais tóxicas conhecidas (LOURENÇO ET AL., 1996). Comprovando seu potencial de rápida expansão, num período de 10 anos (1982 – 1992) o número de indivíduos da espécie *T.bahiensis* coletados na Grande São Paulo aumentou 5,6 vezes, enquanto o número de indivíduos representantes de *T.serrulatus* cresceu 30,3 vezes (VON EICKSTEDT ET AL. 1996).

Inicialmente, o *T.serrulatus* era endêmico de uma área restrita de Minas Gerais, mas tem se expandido notavelmente ao longo dos últimos 300 anos (LOURENÇO ET AL. 1996), (LOURENÇO & CUELLAR, 1996), (VON EICKSTEDT ET AL. 1996). A introdução incidental de poucos exemplares da espécie *T.serrulatus* em um novo ambiente pode levar a sua proliferação rápida. Este fato é de grande relevância epidemiológica, pois pode causar aumento da incidência do escorpionismo em estados onde estes animais são ausentes e que são despreparados para lidar com o tipo de acidente provocado. Esta situação já foi reportada no Rio Grande do Sul (TORRES ET AL., 2002), e vem sendo monitorada cuidadosamente pelas autoridades sanitárias (SUCEN E SES, 2007).

Talvez por ser o habitat original do *T.serrulatus*, Minas Gerais é claramente o estado onde a situação do escorpionismo é mais preocupante. Entre os anos de 2001 e 2005, mais de 14.000 notificações de acidentes envolvendo crianças e adolescentes de até 19 anos foram feitas no estado, com a taxa de letalidade oscilando de 0,7% até 1% dos casos, conforme o período (GUERRA ET AL., 2008). Um estudo, conduzido com crianças e adolescentes na cidade de Montes Claros, apontou um percentual de quase 30% dos casos estudados classificados como graves, com mortalidade de 1,5% (HORTA ET AL., 2007). Apesar do grande número de acidentes em Belo Horizonte, um estudo

retrospectivo demonstrou a redução significativa da mortalidade, passando de 5,9%, registrados na década de 40, a 0,2%, no período de 1990-1997, possivelmente devido à implementação e padronização da soroterapia (SOARES ET AL., 2002).

Na Bahia, segunda área mais afetada, foi reportada a existência de áreas urbanas altamente endêmicas na cidade de Salvador (AMORIM ET AL., 2003), sendo o *Tityus stigmurus* o principal agente etiológico desta área (LIRA-DA-SILVA ET AL., 2000).

Apesar de epidemiologicamente menos importante, um estudo conduzido em Santarém, no Pará, mostra que os casos de envenenamento com *Tityus paraensis* apresentam quadro claro acometimento neurológico, com sintomatologia exuberante, como mioclonias, dismetria, disartria, e ataxia de marcha entre outras (PARDAL ET AL., 2003). Esta sintomatologia é bastante diferente da observada em outras espécies de escorpião e são escassos os estudos acerca dos componentes do veneno responsáveis por esses efeitos

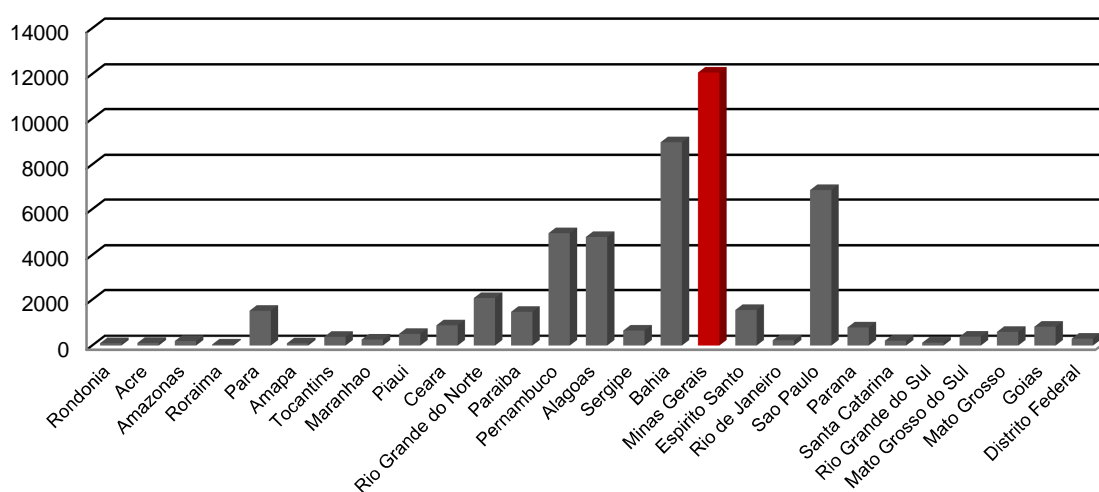


Figura 6: Incidência de acidentes escorpiônicos em 2010, por unidade federativa. Tabulado a partir de dados disponibilizados pelo SINAN.

1.2.2. O veneno

Os venenos escorpiônicos são misturas complexas de substâncias produzidas por glândulas seromucosas e inoculadas por aparato especializado presente no animal.

A produção de substâncias tóxicas é um traço adquirido por seres vivos, ao longo da evolução, como sistema de defesa e mecanismo de captura de presas. Os componentes do veneno têm, portanto, o objetivo de comprometer funções vitais do organismo no qual são inoculados.

1.2.2.1. Composição

Estima-se que existam mais de 100.000 moléculas diferentes nos venenos dos escorpiões existentes ao redor do mundo. Porém, apenas uma ínfima parcela deste rico material é bem conhecida e caracterizada (POSSANI ET AL., 1999). A pequena disponibilidade deste material biológico, devido à relativa pequena quantidade de veneno produzido pelo animal e a ainda menor concentração de cada componente no veneno, torna difícil o isolamento dessas substâncias para a caracterização adequada. O aumento da resolução das técnicas de análise tem ajudado a reverter esse quadro, possibilitando a caracterização utilizando quantidades ínfimas das moléculas de interesse (GAZARIAN ET AL, 2005). Para acompanhar a grande quantidade de informação potencialmente gerada no estudo das toxinas, a bioinformática surge como uma ferramenta importante para a compilação, análise e manipulação dos dados já existentes sobre os venenos e suas toxinas (TAN ET AL., 2003).

Dentre os compostos que já foram identificados no veneno estão: histamina, serotonina, sais diversos, peptídeos, nucleotídeos, aminoácidos, enzimas, inibidores de enzimas e neurotoxinas (DINIZ 1978).

As hialuronidases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise do ácido hialurônico ou hialuronan, um dos principais componentes da matriz extracelular. Sua presença já foi detectada no veneno de vários escorpiões (PESSINI ET AL., 2001), (BATISTA ET AL., 2007), (FENG ET AL., 2008) e de outros animais peçonhentos (DA SILVEIRA ET AL., 2007), (QUEIROZ ET AL., 2008) . Apesar de não serem tóxicas, as hialuronidases favorecem o espalhamento do veneno, pela sua atuação na matriz extracelular, sendo responsáveis pelo estabelecimento rápido do quadro de envenenamento.

A presença de enzimas proteolíticas já foi detectada nos venenos escorpiônicos, com atividade moderada em pH 8,0, pertencendo provavelmente à

família das serino-proteases (ALMEIDA ET AL., 2002). Estas enzimas podem atuar também como fatores de espalhamento do veneno, degradando componentes da região onde é inoculado, facilitando a absorção deste, ou até mesmo serem causadoras diretas de patologias relacionadas ao envenenamento. Uma metaloprotease, capaz de clivar VAMP (vesicle associated membrane protein) foi purificada recentemente do veneno de *T. serrulatus*, demonstrando que ainda há muitos componentes a serem desvendados, mesmo no veneno de escorpiões já bem estudados (FLETCHER ET AL., 2010).

Peptídeos de baixo peso molecular também estão presentes nos venenos escorpiônicos. Estes podem apresentar atividades biológicas diversas e de grande importância, como antimicrobiana (PLESSIS ET AL., 2008), potencializadora da bradicinina (VERANO-BRAGA ET AL., 2008), antitrombótica, anti-malária (GAO ET AL., 2010), dentre outros.

1.2.2.2. Principais Toxinas

Apesar do grande número de componentes, com atividade biológica importante, descritos acima, são as neurotoxinas as grandes responsáveis pelos principais sintomas apresentados no envenenamento por escorpiões.

As neurotoxinas escorpiônicas são proteínas básicas, de baixo peso molecular, que exercem seus efeitos tóxicos pela sua ligação a canais iônicos com alta afinidade. Os canais iônicos formam uma superfamília protéica contando com cerca de 140 membros já identificados, caracterizados pela sua estrutura que se insere na membrana levando a formação de um poro, por onde há fluxo regulado de íons e consequente transmissão de sinais elétricos pela membrana onde estão inseridos. (CATTERALL ET AL, 2007). Sua estrutura tridimensional acaba de ser resolvida por cristalografia, o que deve contribuir muito para o melhor entendimento de seu funcionamento (PAYANDEH ET AL., 2011).

As neurotoxinas escorpiônicas são divididas em quatro famílias principais de acordo com o tipo de canal em que atuam: canais para sódio, canais para potássio, canais para cálcio ou canais para cloro (BECERRIL ET AL, 1997).

As toxinas que afetam canais para sódio são compostas por 60-70 aminoácidos (aa) e são estabilizadas por 4 pontes dissulfeto, sendo responsáveis pela maior parte da toxicidade do veneno.

As que afetam canais para potássio são menores, com 30-40 aa e são estabilizadas por 3 ou 4 pontes dissulfeto (RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2004). Elas atuam como bloqueadores do canal, e são excelentes modelos para o estudo da função destes canais.

Ainda são poucas as toxinas caracterizadas que possuem especificidade para canais para cloro. Elas possuem cerca de 36 aa e 4 pontes dissulfeto. A clorotoxina, o primeiro membro dessa família a ser identificado e caracterizado, a partir da purificação do veneno de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, demonstrou se ligar especificamente ao receptor MMP2 associado a canais para cloro, altamente expresso em tumores de células da glia (gliomas), mas não em tecidos normais. Seu análogo sintético (TM-601) ligado ao iodo radioativo foi aprovado pela Food and Drugs Administration (FDA) para o tratamento desse tipo de câncer e testes clínicos de fase I já foram realizados com sucesso (MAMELAK ET AL. 2006) e vem sendo também utilizado para o diagnóstico deste tipo de câncer (HUANG ET AL., 2011). Devido a este potencial anti-tumoral verificado para este tipo de toxina, a busca por clorotoxinas no veneno de outros escorpiões foi objeto de estudos recentes (RJEIBI ET AL. 2011).

As toxinas para canais para cálcio não têm sua estrutura definida e ainda não contam com muitos membros identificados, mas devem ser de grande interesse, uma vez que o influxo de cálcio através destes canais é um mecanismo importante para a transdução de sinais (CATTERALL ET AL, 2007).

Por serem as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno, as toxinas para canais para sódio, estudadas neste trabalho, serão descritas mais profundamente, em especial as α -toxinas.

A classificação mais utilizada para as toxinas escorpiônicas para canais para sódio se baseia no seu papel fisiológico como moduladores do mecanismo do canal e em estudos comparativos com outras toxinas já caracterizadas. Estas neurotoxinas são

capazes de exercer basicamente dois efeitos distintos: diminuir a velocidade da inativação do canal, propriedade atribuída às chamadas α -toxinas; ou precipitar a sua ativação, tornando o canal sensível a voltagens mais baixas, efeito causado pelas chamadas β -toxinas (REVISADO POR RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005).

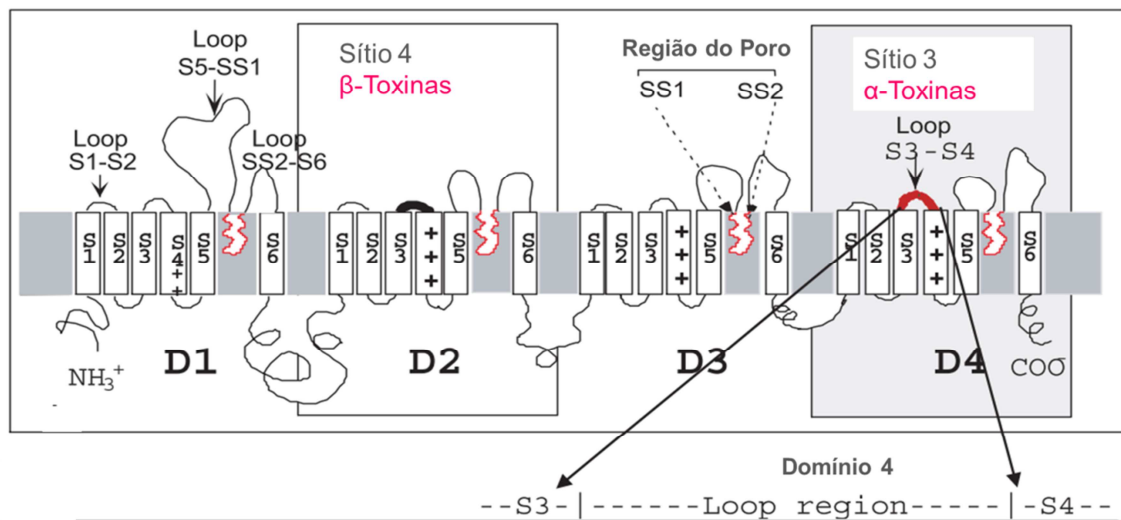


Figura 7: Desenho esquemático da estrutura de um canal para sódio. As β -toxinas se ligam no domínio 2 do canal, em um loop entre os segmentos transmembrana 3 e 4 enquanto as α -toxinas se ligam no domínio 4, em loop também entre os segmentos 3 e 4. Adaptado de GORDON ET AL.2007.

De acordo com o alvo de seu efeito farmacológico, as α -toxinas escorpionicas podem ainda ser classificadas em três sub-grupos: α -clássicas, α -like e anti-inseto . As α -clássicas apresentam alta toxicidade para mamíferos, ligando-se com alta afinidade às sinaptossomas de cérebro de rato, e baixa toxicidade detectada em insetos; as α -inseto-toxinas atuam, evidentemente, em insetos, sendo praticamente inócuas em mamíferos quando injetadas por via intracerebroventricular; e as α -like atuam tanto em mamíferos (apenas por via intrecerebroventricular) quanto em insetos, porém não se ligam a sinaptossomas de cérebro de rato, competindo fracamente com as α -clássicas (REVISADO POR BOSMANS & TYTGAT, 2007).

Diversos dados indicam a presença de uma região estrutural, farmacologicamente ativa, conservada para as toxinas do tipo α -clássicas. Esta seria formada por dois domínios: um chamado domínio NC, composto por uma volta de 5 resíduos localizada próxima a região N-terminal (resíduos de 8-12) mais a porção C-

terminal da molécula; e outro chamado domínio nuclear (“core domain”) formado por alguns resíduos centrais, por volta do resíduo 40, que compõem o loops que interconectam os elementos estruturais secundários (LIU ET AL., 2005), (REVISADO POR RODRÍGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005), (REVISADO POR BOSMANS & JAN TYTGAT, 2007) (WEINBERGER ET AL., 2010).

Apesar de se ligarem em dois alvos diferentes no canal para sódio voltagem dependente, é provável que as α e β toxinas atuem sinergisticamente. Cohen e colaboradores, em 2006, verificaram que a ligação de β -toxinas no sítio 4 do canal, mesmo em formas mutantes não-tóxicas, é capaz de influenciar a ligação de α -toxinas no sítio 3, aumentando a sua toxicidade. Esse fenômeno sugere um papel funcional potencial para proteínas de baixa ou nenhuma toxicidade presentes no veneno, justificando sua existência.

Estas moléculas desprovidas de toxicidade detectável, porém de grande semelhança com as neurotoxinas também estão presentes no veneno. A importância funcional e a conservação de tais moléculas de pouca ou nenhuma atividade tóxica ainda não são questões resolvidas. (Ab8, Amm8, Ac4, Amm9, TsNTxP). É possível que estas possuam, de fato, alvos específicos, porém que ainda não foram identificados. É possível que estas moléculas atuem sinergisticamente com outros componentes do veneno, conforme sugerido por (COHEN ET AL. 2006). Outra possibilidade é que os genes destas proteínas tenham sido mantidos visando à disponibilização de um grande número de loci para possíveis mutações e duplicações, vantajosas para a diversificação do repertório de toxinas do animal ao longo da evolução.

1.2.3. Sintomatologia do Envenenamento

A maior parte dos sintomas do envenenamento é resultante da grande liberação de catecolaminas e acetilcolina, gerada pelo prolongamento e desregulação do potencial de ação provocados pelas neurotoxinas do veneno (REZENDE ET AL. 1996). Entretanto, parte dos efeitos patológicos do veneno, como o perfil inflamatório estabelecido, não é completamente explicada por isso, sendo aventada a participação de outros mediadores, como quininas e citocinas (ANDRADE ET AL. 2007), (PESSINI ET AL. 2006) e mecanismos (DE MATOS ET AL. 2001) (MEKI ET AL. 2003). É possível também que

cardiotoxinas específicas estejam presentes no veneno, sendo em parte responsáveis diretas pelos efeitos cardíacos observados (TEIXEIRA ET AL., 2001).

Tabela 1: Manifestações clínicas mais freqüentes nos acidentes escorpiônicos. Adaptado do website do Ministério da Saúde.

CLASSIFICAÇÃO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
Leve	Dor e parestesia locais.
Moderado	Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, como náuseas, vômitos, sudorese, sialorréia discretos, agitação, taquipnéia e taquicardia.
Grave	Além das citadas na forma moderada, presença de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorréia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque.

Além da sintomatologia clássica descrita na tabela acima, outras condições clínicas também são apresentadas em decorrência do escorpionismo, como pancreatite (ALMEIDA ET AL, 2002), edema cerebral (ROMERO & HERNANDEZ, 2005), comprometimento renal (ALVEZ ET AL. 2005) e manifestações neurológicas severas (BAHLOUL ET AL. 2005).

1.2.4. Tratamento

O tratamento recomendado para casos de envenenamento escorpiônico consiste na imunoterapia com antiveneno específico e suporte para resolução de sintomatologia observada (WHO, 2007).

O antiveneno deve ser injetado por via intravenosa e o mais rápido possível após o envenenamento, para obter máxima eficácia (KRIFI ET AL., 2005). O uso de antiveneno adequado conforme a espécie causadora do acidente, de alta potência e especificidade também são fatores determinantes do sucesso do tratamento.

Vários trabalhos apontam a eficácia da imunoterapia para a neutralização dos efeitos tóxicos do veneno, ao redor do mundo. Na Tunísia, o grupo do Dr. Mohammed El Ayeb (KRIFI ET AL., 2005), demonstrou neutralização eficiente da fração tóxica de *Androctonus australis garzonii* em coelhos. Estudo anterior com o antiveneno contra o escorpião *Buthus occitanus tunetanus* apresentou resultados semelhantes, chamando atenção para a importância da dose apropriada para otimização do tratamento (KRIFI ET AL., 2001).

Na Turquia, o antiveneno produzido contra o veneno do escorpião *Androctonus crassicauda* foi capaz não só de neutralizar eficientemente o veneno cognato, mas ainda o veneno de *Mesobuthus eupeus*, em camundongos (OZKAN & CARHAN, 2008). Esse tipo de estudo é extremamente necessário para orientar a escolha do antiveneno utilizado no tratamento.

O trabalho de Ghalim e colaboradores, em 2000, no Marrocos, demonstrou, em estudo clínico, a eficiência do antiveneno na diminuição dos níveis circulantes de toxinas do escorpião *Androctonus mauretanicus mauritanicus* e *Buthus occitanus tunetanus* e a consequente redução da morbidade relacionada. O estudo relaciona a eficiência do tratamento com o tempo decorrido do envenenamento até o tratamento, chamando a atenção para a importância de um atendimento rápido e a dose adequada de antiveneno administrada.

Na Arábia Saudita, o relato dos 12 anos de experiência com a soroterapia foi feito por Hamed e colaboradores, em 2001. A análise de mais de 3000 casos de envenenamento com os escorpiões *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* e *Androctonus crassicauda* tratados com antiveneno demonstrou redução significativa na mortalidade (de até 8% a 0,05%) e no aparecimento de sintomatologia grave, reduzindo ainda o tempo de permanência no hospital.

Mesmo na Índia, onde o tratamento com drogas para os acidentes com escorpiões prevalece sobre o tratamento com o antiveneno, um estudo com um grupo de pacientes envenenados com o escorpião *Mesobuthus tamulus* demonstrou que o tratamento com Prazozina, um bloqueador de receptor adrenérgico α_1 , administrada

simultaneamente com o antiveneno levou a uma recuperação mais rápida e eficiente dos sintomas de envenenamento (7 horas em média) do que o tratamento apenas com Prazozina (18 horas em média). Este estudo foi conduzido sem nenhum tipo de financiamento, o que evidencia a falta de interesse da comunidade científica em buscar tratamentos melhores e mais eficientes (BAWASKAR & BAWASKAR, 2011).

No México, a ampla utilização de antiveneno especialmente desenvolvido (ALACRAMYN ou agente faboterápico) como tratamento para casos de escorpionismo reduziu as mortalidades decorrentes do envenenamento por *Centruroides* dramaticamente (POSSANI, 2000).

No Brasil, Revelo e colaboradores, em 1996, também demonstraram, através de estudos de biodistribuição do veneno, inoculado sozinho ou em conjunto com o antiveneno, que o soro é capaz de reduzir as concentrações circulantes do veneno. Apesar de não conseguir reverter os quadros mais graves de envenenamento, sendo necessário um tratamento mais agressivo da sintomatologia nesses casos, o uso do soro antiescorpiônico seria importante para impedir o estabelecimento desses sintomas graves, donde a importância da sua administração precoce. Estudos clínicos conduzidos no estado de Minas Gerais, utilizando soro específico para o gênero *Tityus* produzido na fundação Ezequiel Dias, apontam para a sua eficácia na reversão dos sintomas, quando utilizados em casos graves de envenenamento (GUERRA ET. AL., 2008).

Apesar das diversas evidências, ainda há controvérsias a respeito da real eficácia clínica dos antivenenos para o tratamento de envenenamento escorpiônicos, suscitando muitas discussões acerca do assunto (BOYER, ALAGON, & THEODOROU, 2009). Um estudo clínico randomizado, conduzido por Abroug e colaboradores, em 1999, não conseguiu atestar o benefício na administração do antiveneno, independente da gravidade dos sintomas. Este estudo, porém, contou com número limitado de pacientes em estado grave, o que torna difícil tirar conclusões definitivas a este respeito. Uma amostragem maior é ainda necessária para confirmar esses resultados. O estudo baseado em evidências de Foex & Wallis, 2005, mostra que, apesar de haver bons indícios de que o antiveneno é capaz de reduzir as concentrações séricas do veneno, ainda não é claro se este tratamento é capaz de efetivamente melhorar o

estado clínico final do paciente. Bawaskar, em 2005, atesta que a soroterapia não é mais recomendada como o principal tratamento nos casos de envenenamento com o escorpião *Mesobuthus tamulus*, uma vez que não foi observado benefício na sua administração.

As diferenças na composição e potência do veneno dos diferentes escorpiões, bem como a disparidade na qualidade dos antivenenos produzidos tornam difícil qualquer generalização sobre a eficácia do tratamento pela soroterapia. Além disso, as várias espécies de escorpião ocasionam sintomatologias diversas, contra as quais o tratamento com o soro alcança níveis diferentes de êxito, sendo difícil uma conclusão geral acerca do assunto. (BOYER ET AL., 2009). Estudos clínicos randomizados úteis a comprovar definitivamente a eficácia da soroterapia são escassos, geralmente incompletos e pobres em sua argumentação (CHIPPAUX, 2010), sendo necessário um maior esforço da comunidade científica no sentido de realmente validar essa abordagem.

Além do tratamento com o antiveneno, suporte às funções vitais, com oxigênio, reposição de volume e monitoramento dos parâmetros hemodinâmicos são recomendados. O tratamento da sintomatologia, já estabelecida por meio de outras drogas, deve ser feito apenas por profissionais da saúde qualificados e após análise cuidadosa do paciente, devido à complexidade dos mecanismos envolvidos na síndrome do envenenamento. O uso de outros medicamentos como anti-hipertensivos (Prazozina, Captopril e outros) podem gerar resultados satisfatórios em quadros de acometimento cardíaco-respiratório (BASWASKAR AND BASWASKAR, 2000), (KRISHNAN ET AL., 2007). A coadministração de anticonvulsivantes, antieméticos, antipiréticos e analgésicos é recomendada para a reversão dos sintomas já estabelecidos.

Reações adversas, reportadas anteriormente com certa frequência em decorrência do tratamento com imunoterápicos, como a anafilaxia e a doença do soro, não são muito observadas no tratamento do envenenamento escorpiônico. Além de atualmente serem utilizados antivenenos de melhor qualidade e o tratamento prévio com anti-histamínicos dos pacientes que venham a receber o soro (FUKUHARA ET AL. 2003) se mostrar eficaz, no caso particular do veneno escorpiônico, o alto nível de

catecolaminas circulantes devido ao envenenamento atua como profilaxia natural, prevenindo a reação anafilática contra o soro administrado.

1.2.5. *Produção do Soro Anti-escorpiônico*

Desde que Calmette, Phisalix e Bertrand observaram, no final do século XIX, que animais imunizados com toxinas produziam anticorpos contra essas substâncias e que esses anticorpos poderiam ser úteis na neutralização do veneno de animais peçonhentos em acidentes humanos, este protocolo tem sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de antídotos para tratamento dos casos envenenamento (REVISADO POR ESPINO-SOLIS, 2009).

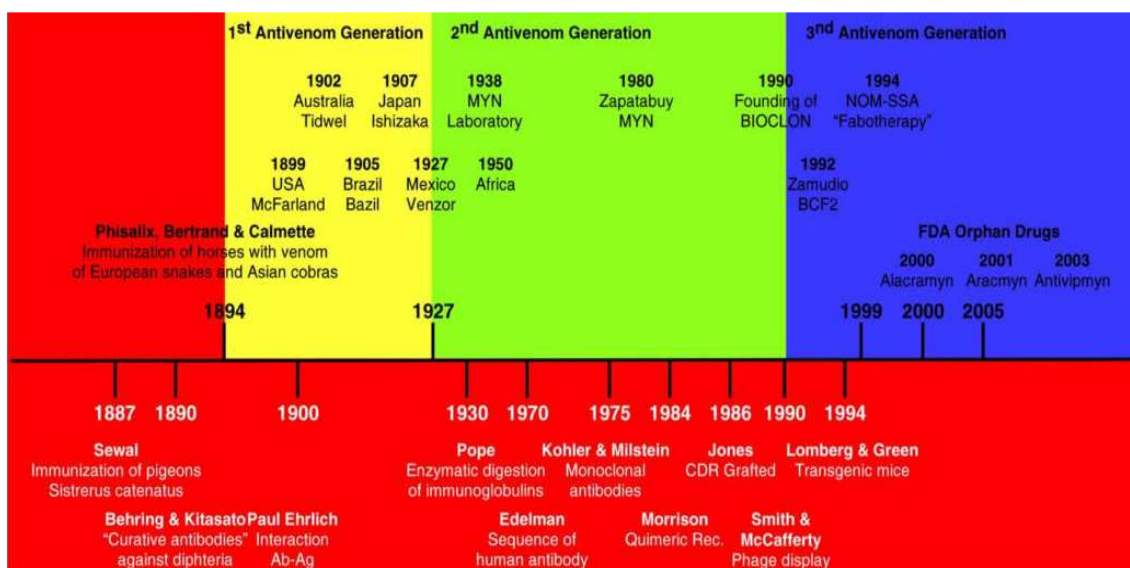


Figura 8: Marcos no desenvolvimento de antivenenos. Acima da linha do tempo são mostrados os marcos do desenvolvimento dos antivenenos e abaixo da linha estão destacados os avanços da ciência que permitiram tal desenvolvimento. (retirado de ESPINHO-SOLIS ET AL.,2009)

Os antivenenos são feitos a partir do plasma de animais hiperimunizados com um ou mais venenos contra os quais se deseja obter a neutralização. A chamada 1ª geração de antivenenos utilizava o soro hiperimunizados bruto. A partir do fim da década de 30, as imunoglobulinas, agentes responsáveis pela neutralização efetiva do veneno, passaram a ser extraídas do soro, através de purificações ou precipitações com sulfato de amônio ou ácido caprílico, constituindo uma 2ª geração de antivenenos a partir do plasma fracionado. Este produto mais “limpo” é livre de outras moléculas do

soro que, além de não contribuírem para a neutralização, podem gerar reações anafiláticas no paciente. Esta preparação é ainda utilizada até os dias atuais. O processamento das imunoglobulinas, através da clivagem de sua porção Fc, separando-a de sua porção de efetiva ligação ao antígeno, a Fab, refinou ainda mais a preparação dos antivenenos, constituindo a sua 3ª geração. Outras preparações feitas a partir dos fragmentos de imunoglobulinas, anticorpos recombinantes, monoclonais e a produção em animais de outras espécies que apresentem imunoglobulinas peculiares têm sido estudados, constituindo a possibilidade de uma futura 4ª geração de medicamentos.

Os grandes avanços na produção do antiveneno nos últimos 20 anos contrastam com o fato de que a obtenção da matéria prima a partir da qual essas preparações são manufaturadas, continua sendo feita da mesma maneira proposta por Calmette, em 1894: a hiperimunização de animais de grande porte com um ou mais venenos de interesse médico. Isso atesta o sucesso e eficiência da metodologia, demonstrando que anticorpos neutralizantes eficazes podem ser obtidos desta maneira. Porém é preciso levar em consideração os problemas decorrentes desta prática.

O animal produtor recebe injeções de material extremamente tóxico, e mesmo que adjuvantes tenham efeito detoxificante sobre a mistura, as repetidas doses fazem com que o animal sofra com os sintomas do envenenamento. Os animais utilizados na produção de antivenenos possuem saúde extremamente debilitada e expectativa de vida reduzida (CHIPPAUX & GOYFFON, 1998), (GAZARIAN ET AL. 2005), o que levanta importantes questões bioéticas a respeito da produção dos antivenenos.

Além dessa questão importante, outros problemas incorrem da utilização dos venenos brutos para a imunização. Em alguns casos, a disponibilidade de veneno para a imunização é escassa, como no caso das serpentes do gênero *Micrurus*, que não são facilmente mantidas em cativeiro, além de não disponibilizarem grandes quantidades de veneno. Os aracnídeos são animais de pequeno porte, sendo necessária a criação de uma grande quantidade destes animais para se obter a quantidade necessária de veneno para imunização.

Conforme descrito, os venenos são misturas complexas de vários compostos, sendo muitos deles insignificantes para o efeito tóxico do veneno. Porém, por se tratar de material exógeno, estes compostos não tóxicos também incitariam a produção de anticorpos contra eles no animal produtor, gerando um efeito de diluição dos anticorpos realmente importantes para a neutralização do efeito tóxico no produto final (MARIA ET AL., 2005). A eficiência dos componentes do veneno em incitar uma resposta imunológica satisfatória é variada. Deste modo, toxinas de alta potência, porém menos imunogênicas terão menos anticorpos dirigidos a elas no soro final obtido, comprometendo a potência do soro. Muitas vezes, os componentes mais tóxicos dos venenos representam apenas uma ínfima parte de sua composição total, também comprometendo a geração de anticorpos contra eles (MARTIN-EAUCLAIRE ET AL., 2006). Além disso, alguns componentes do veneno podem afetar o sistema imune do animal, prejudicando a resposta e produzindo soros de menor potência (PETRICEVICH, 2010).

Desse modo, esforços científicos no intuito de desenvolver imunógenos mais eficientes e menos agressivos para o animal produtor, são de grande interesse. Mesmo que nenhum destes estudos tenha prosseguido até a realização de testes clínicos, imunógenos alternativos, como peptídeos sintéticos, anatoxinas, toxinas recombinantes e mesmo as próprias toxinas escorpiônicas detoxificadas, vêm sendo propostos ao longo dos últimos anos (SHINNICK ET AL., 1983), (CALDERON-ARANDA ET AL., 1995), (KHARRAT ET AL., 1997), (DEVAUX ET AL., 1997), (CHAVEZ-OLÓRTEGUI ET AL., 1997), (SRAIRI-ABID ET AL., 2000), (MENDES ET AL., 2008).

O uso de peptídeos sintéticos como imunógenos para a produção de antivenenos apresentam certas vantagens sobre o uso do veneno total e de suas toxinas purificadas. Trata-se de um imunógeno completamente desprovido de toxicidade (BAHRAOUI ET AL., 1996), (DEVAUX ET AL., 1996), que possui custo razoável e que permite o controle de qualidade produção, com segurança e alto grau de pureza (HIJNEN ET AL., 2007). Além disso, os peptídeos sintéticos dão origem a um antiveneno mais homogêneo, uma vez que este não estaria sujeito à variação intraespecífica de composição observada no veneno bruto (CHAVEZ-OLORTEGUI, 1997).

Para que estas novas alternativas possam chegar à fase de testes clínicos e alcançar uma aplicação direta na produção de antivenenos, é importante um estudo mais cuidadoso da imunologia envolvida, obtendo-se informações sobre a estrutura e antigenicidade das principais proteínas presentes no veneno e dos imunógenos derivados destas, e sobre as propriedades dos anticorpos originados contra eles (CALDERON ARANDA, 1995). Com isso, além de uma melhoria nas condições de vida do animal produtor, será possível a produção de imunoglobulinas mais específicas e de maior afinidade, direcionadas de fato para a neutralização dos agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno.

Em 2001, foi realizado um encontro mundial, promovido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), para discutir a padronização e controle da produção dos antivenenos. Foi consenso geral que o método de produção, apesar de contar com algumas melhorias nos protocolos de purificação e inativação viral, necessita de maior atenção por parte dos pesquisadores para que outras etapas deste possam ser melhoradas (THEAKSTON ET AL. 2003). As inovações propostas, no entanto devem ser bem testadas e justificadas, para que não haja um aumento desnecessário no custo de produção (KRIFI ET AL, 1999).

Outro encontro mundial promovido pela Organização Mundial de Saúde visando propostas para a melhoria da qualidade e aumento da produção de antivenenos ofídicos e escorpiônicos de maneira global se deu em Genebra, em 2007 (WHO, 2007). Neste encontro, vários pontos importantes para a produção e uso efetivo de antivenenos foram ressaltados. Dentre os problemas apresentados estão a produção inferior a demanda mundial; o alto preço dos produtos finais; a distribuição errada e ineficiente do medicamento; a falta de instalações adequadas para o atendimento dos acidentes nas regiões mais endêmicas; o falta de treinamento dos profissionais da saúde para o atendimento dos casos de envenenamento; o uso equivocado de antiveneno específico para determinado veneno para tratamento de outra espécie, sem que haja estudo que ateste a reatividade cruzada entre eles; a falta de regulação, controle de qualidade na produção e biossegurança do produto.

1.2.6. Aplicações Biotecnológicas do Veneno de Escorpião

O estudo do veneno escorpiônico, além de sua evidente relevância médica, é de grande importante biotecnológica.

Pequenos peptídeos presentes no veneno escorpiônicas podem ser de grande interesse para a criação de novas drogas, servindo como moldes tridimensionais para pequenas moléculas que possuam propriedades farmacológicas interessantes (HARVEY ET AL., 1996), (CHONG LI ET AL., 2008).

As neurotoxinas constituem excelentes ferramentas para a investigação da função de canais iônicos, devido à interação forte e específica existente entre este par. Assim, é possível estudar a influência dos canais em diversas circunstâncias fisiológicas e patológicas do organismo. As toxinas auxiliam ainda na elucidação da correlação entre estrutura e função dos canais iônicos e seu mecanismo de ação (CATTERALL ET AL., 2007).

O canal para potássio dependente de cálcio de alta condutância (BKca) esta diretamente envolvido na broncoconstrição e broncodilatação. O veneno escorpiônico possui toxinas que bloqueiam este canal, como a Caribdotoxina, do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, e são ferramentas úteis para o estudo da ação de broncodilatadores utilizados em casos de asma, ajudando a melhorar o tratamento existente e propor novas abordagens para esta e outras doenças respiratórias (ROGERS ET AL., 1996).

As toxinas escorpiônicas podem ainda ter efeito analgésico, ocasionando anti-hiperalgesia periférica, através da modulação de canais para sódio no nociceptor (WANG ET AL., 2000).

Outra importante aplicação biotecnológica para o veneno de escorpião é a utilização das suas inseto-toxinas, que possuem alta especificidade para canais iônicos de invertebrados e são inócuas para mamíferos, como moldes para o desenvolvimento de inseticidas. O uso intensivo de inseticidas clássicos induziu à resistência de diversas espécies de inseto à estas substâncias, tornando necessária a sua substituição por novas formulações mais eficientes (ZLOTKIN ET AL., 2000).

1.3. Toxinas estudadas

Compreender a relação estrutura-antigenicidade nas toxinas de escorpião para canais para sódio voltagem dependentes constitui um desafio, uma vez que estas demonstram uma grande diversidade antigênica, apesar de sua grande homologia estrutural.

Dentre os milhares de toxinas existentes nos venenos escorpiônicos, quatro foram selecionadas para este estudo de epitopos conformacionais, tendo em vista as suas características peculiares: TsNTxP, Amm8, AaH2 e Ts3.

A TsNTxP e a Amm8 são “anatoxinas”, ou seja, proteínas presentes no veneno que possuem alta similaridade com as toxinas que atuam em mamíferos e no entanto não apresentam toxicidade detectável nesses modelos. Além disso, essas moléculas quando utilizadas como imunógenos, são capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes que reagem com outros componentes tóxicos do veneno. Essas propriedades fazem destas “anatoxinas” alvos interessantes para estudos imunológicos, uma vez que podem ser potencialmente utilizadas na produção do antiveneno escorpiônico, além de serem importantes para a elucidação das bases moleculares que definem a toxicidade das demais moléculas do veneno.

A AaH2 é considerada o arquétipo das α -toxinas clássicas e é uma das toxinas escorpiônicas mais bem estudadas. Assim, há um grande número de dados disponíveis para a comparação e validação de novos resultados e metodologias. Além disso, um anticorpo monoclonal altamente neutralizante, mAb 4C1 (BAHRAOUI ET AL., 1988), já foi desenvolvido contra essa toxina e também extensivamente caracterizado (MOUSLI ET AL., 1999), (JUSTE ET AL., 2007). Essa dupla antígeno-anticorpo torna-se então um objeto de estudo interessante para a validação das metodologias de predição de epitopos descontínuos propostas por este trabalho.

O principal responsável pelos acidentes com escorpiões no Brasil é o *T.serrulatus*, sendo esta a espécie mais abundante, mais disseminada e mais letal do país. Dentre os componentes do seu veneno, o que apresenta a maior toxicidade é a

Ts3. Ela é, portanto, um dos principais alvos para a neutralização dos efeitos tóxicos do veneno, sendo importante também o seu estudo.

1.3.1. TsNTxP (“Ts4”)

A TsNTxP (*Tityus serrulatus* non-toxic protein) é uma “anatoxina” natural presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, identificada por Chávez-Olórtegui em 1996 a partir de duas cromatografias subsequentes: filtração molecular e troca iônica. Uma proteína semelhante, diferenciada por apenas uma glicina a menos em seu C-term e a troca de um ácido aspártico por um glutâmico na posição 50, foi identificada por Marangoni, 1990, mas não foi caracterizada.

As diretrizes de nomenclatura atual propõem que a TsNTxP seja referida como Ts4. Entretanto, o artigo publicado a partir do trabalho desta tese utilizou a nomenclatura antiga. Dessa maneira, para evitar maiores desentendimentos, excepcionalmente neste caso, utilizaremos ainda o nome TsNTxP.

GREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSETNKCG

Figura 9: Sequência primária da TsNTxP. As cisteínas estão destacadas em vermelho.

A TsNTxP é uma proteína básica composta por 63 resíduos de aminoácidos, que lhe confere peso molecular de 6752 Da. Exibe 65% de homologia com a Ts1, 45% com a Ts3, estando aparentemente mais relacionada com as β -toxinas. Uma região entre as posições 15-21 apresenta maior caráter hidrofóbico, constituindo uma região de baixa homologia (CHAVEZ-OLORTEGUI ET AL., 1997). Possui 8 cisteínas que formam 4 pontes dissulfeto, caracterizando-a como membro da superfamília de toxinas escorpiônicas longas de 4 C-C, da subfamília α , segundo anotação do, UniProtKB/Swiss-Prot.

Além de não apresentar toxicidade em mamíferos, mesmo quando injetada em altas doses, a TsNTxP se mostrou capaz de fomentar a produção de anticorpos que possuem capacidade neutralizante em relação aos efeitos tóxicos e letais do veneno total (CHAVEZ-OLORTEGUI ET AL. 1997). Os anticorpos anti-TsNTxP então produzidos, além de reconhecerem propriamente o veneno total de *T. serrulatus* e sua fração tóxica em ELISA, apresentam ligação moderada ao veneno de *T. cambridgei* (recentemente

renomeado *T.obscurus*) e *T. stigmurus*. Além disso, anticorpos anti-TsNTxP se ligam de maneira detectável à Ts3 e à Ts1, respectivamente α e β toxinas do veneno. Quantidades equivalentes a 20 DL50 do veneno total de *T.serrulatus* foram efetivamente neutralizadas por 1 ml do soro anti-TsNTxP e camundongos imunizados com esta proteína resistiram a desafio com 4 DL50 da fração tóxica do veneno (TsFG50) (MOREIRA-FERREIRA ET AL., 1998).

A clonagem da TsNTxP foi produzida por Guatimosim et al, em 1999. O gene da TsNTxP foi isolado a partir de uma biblioteca de expressão de cDNA da glândula de veneno do escorpião, com o auxílio de anticorpos anti-TsNTxP. A sua seqüência nucleotídica foi obtida e revelou a presença de um peptídeo sinal de 19 resíduos e indicou o possível processamento de duas lisinas na extremidade C-terminal por carboxipeptidases. A seqüência identificada demonstrou alto grau de similaridade com as seqüências das neurotoxinas de *T.serrulatus*.

A seqüência gênica da TsNTxP foi clonado em *E.coli* BL21DE3, fusionado a proteína ligante de maltose (MBP) para evitar a degradação citosólica da proteína no vetor (GUATIMOSIM ET AL. 2000). A proteína recombinante foi expressa e utilizada com sucesso como imunógeno em coelhos. Os anticorpos anti-TsNTxP recombinante demonstraram também possuir reatividade cruzada com diferentes antígenos e capacidade neutralizante.

O mapeamento de regiões epitópicas lineares da TsNTxP foi realizado, através da metodologia de SPOT (ALVARENGA ET AL. 2002). Este ensaio revelou três regiões antigênicas principais nas regiões N-terminal, central e C-terminal. Peptídeos apresentando essas seqüências identificadas juntamente com um epitopo predito de Ts3 foram sintetizados, acoplados ao KLH e utilizados como imunógenos. O soro produzido por estes peptídeos foi capaz de neutralizar 13.5 DL50 por mL. Esse soro também apresentou reatividade cruzada moderada com o veneno das outras espécies de *Tityus* relacionadas e ainda com o veneno do escorpião *Centruroides sculpturatus*.

Estudos anteriores, utilizando a técnica de radioimunoensaio (RIA), demonstraram a baixa reatividade cruzada existente entre anticorpos produzidos contra

uma toxina escorpiônica de uma determinada classe específica e toxinas de outras classes (DE LIMA ET AL. 1993). Portanto, quando a TsNTxP se mostrou eficiente na produção de anticorpos reativos com ambas as classes de toxinas por ELISA, um estudo foi realizado para entender os mecanismos por trás dessa propriedade (CHAVEZ-OLORTEGUI ET AL. 2001).

Experimentos de mapeamento de epitopos foram realizados e identificaram mais uma vez as regiões N-terminal (1-15) e C-terminal (47-61) como sendo antigênicas. Esses peptídeos foram sintetizados e utilizados como imunógenos. Os anticorpos gerados apresentam capacidade neutralizante contra uma mistura contendo as toxinas do veneno de *T.serrulatus*. A identificação de resíduos críticos dentro dessas regiões demonstrou que vários deles se encontravam conservados nas demais toxinas (Glu 3, Tyr 5, Asp 8, Asp 50, Trp 55 and Lis 61). Apenas um único resíduo (Glu 58) demonstrou ser exclusivo da TsNTxP.

A estrutura tridimensional da TsNTxP foi modelada e os resíduos identificados como antigenicamente importantes estavam expostos na superfície da molécula, sendo 5 deles agrupados na região dada como sítio de ligação ao canal da proteína. Esses resíduos também encontram expostos na superfície da estrutura tridimensional modelada para as toxinas do veneno de *T.serrulatus*. É possível então que esses resíduos expostos conservados estejam envolvidos na ação tóxica das neurotoxinas e sejam eles os responsáveis pelo reconhecimento e conseqüente neutralização por anticorpos anti-TsNTxP. Nas toxinas, estes resíduos conservados não seriam tão imunogênicos quanto na TsNTxP, explicando possivelmente a falta de reatividade cruzada observada entre anticorpos dirigidos contra as diferentes classes de toxinas.

O resíduo aparentemente exclusivo da TsNTxP, Glu58, pode alterar a superfície eletrostática da face correspondente a um provável sítio ativo das toxinas, através da carga negativa presente na cadeia lateral deste resíduo. As demais toxinas apresentam caráter positivo nesta mesma região, sendo esta uma diferença marcante que pode explicar a inocuidade desta molécula para mamíferos. Uma vez que linfócitos B e T expressam canais para sódio, potencialmente susceptíveis à ação das toxinas escorpiônicas, pode-se especular que a TsNTxP, por não apresentar este efeito,

conduziria a uma resposta imunológica mais eficiente. Essa hipótese carece ainda de vários estudos para a sua confirmação, mas pode ser mais uma possibilidade que explique a produção de anticorpos polirreativos pela imunização com esta molécula.

O mapeamento de epitopos da TsNTxP utilizando diferentes modelos animais (camundongos, coelhos e ovelhas) também demonstrou que, apesar de cada animal apresentar um padrão de reatividade diferenciado, as regiões N-terminal e C-terminal são fortemente reconhecidas como imunogênicas em todos eles (MENDES ET AL. 2004).

1.3.2. Amm8

A Amm8 é uma “anatoxina” isolada do veneno do escorpião *Androctonus mauretanicus mauretanicus* que, juntamente com o escorpião *Buthus occitanus*, é responsável pela maior parte dos casos de envenenamento no Marrocos, chegando a mais 40.000 acidentes por ano, segundo dados epidemiológicos preliminares (GHALIM ET AL., 2000).

Ela foi isolada através de um screening do veneno de *A.mauretanicus mauretanicus* purificado, utilizando soro anti-AaH2, para busca de análogos da α -toxina (ALAMI ET AL., 2003). Foram identificadas duas frações obtidas por HPLC, a partir da fração tóxica do veneno purificado em Sephadex G50, reativas por ELISA com o soro anti-AaH2. Uma das frações identificadas foi tóxica para camundongos quando injetada por via intracerebroventricular (DL50 de 11,25 μ g/kg) e totalmente desprovida de toxicidade quando injetada por via subcutânea (>1mg/animal). Essa fração foi então novamente purificada em coluna Mono-Q, levando ao isolamento de um único componente, denominado Amm8, que constitui 0,023% do peso seco do veneno.

O gene da Amm8 foi amplificado a partir do DNA genômico de *A. mauretanicus mauretanicus* e sequenciado (ALAMI ET AL., 2006). A sequência nucleotídica do gene da Amm8 codifica 85 resíduos, sendo que destes, 19 fazem parte de seu peptídeo sinal. Além disso, o último aminoácido da sequência é clivado por carboxipeptidases após a tradução. Sua sequência madura possui então 65 resíduos e massa molecular de 7382 Da. Possui 8 cisteínas que formam 4 pontes dissulfeto, caracterizando-a como membro

da superfamília de toxinas escorpiônicas longas de 4 C-C. Ela compartilha 88% de similaridade de sequência com a AaH2. Após análises de sequência de cDNA e da proteína purificada, concluiu-se que a Amm8 é idêntica ao componente P4, isolado por Rosso & Rochat em 1985. Estes autores não prosseguiram com os estudos desta molécula, considerando o resultado obtido previamente como um provável artefato da estimulação elétrica utilizada na extração do veneno.

LKDGIVNDINCTYFCGRNAYCNELCIKLGESGYCQWASPYGNSCYCYKLPDHRVTKGPGRCND

Figura 10: Sequência primária da Amm8. As cisteínas estão destacadas em vermelho.

Analisando-se os dados de sequência, foi verificado que a Amm8 possui um resíduo adicional em seu C-terminal, Asp65, que é incomum na sequência de outras α -toxinas e pode ser responsável pela falta de toxicidade desta proteína. Esse fenômeno poderia ocorrer através de impedimento estérico causado pela Asp65 para a ligação da Amm8 no sítio específico das α -toxinas clássicas no canal para sódio voltagem-dependente. A Amm8 foi então modelada para verificar as possíveis alterações estruturais causadas pela presença deste aminoácido. O modelo demonstrou que, apesar de não gerar grandes alterações conformacionais, a presença da Asp65, por ser um resíduo carregado, altera drasticamente a distribuição de cargas, mudando também o momento dipolar da proteína e possivelmente sua interação com o canal para sódio voltagem-dependente. Este mesmo trabalho de Alami e colaboradores verificou, através de experimentos de voltage clamp, que a Amm8 se liga preferencialmente a canais do tipo NaV 1.2 do que a canais NaV 1.4. A Asp65 pode estar também relacionada a este tipo de seletividade de alvo.

Por ser desprovida de toxicidade e possuir alta similaridade com as principais α -toxinas, a Amm8 é uma candidata interessante para ser utilizada como imunógeno para a produção de anti-venenos. Visando este fim, a Amm8 foi utilizada para imunizar coelhos. A Amm8 mostrou-se imunogênica, dando origem a um soro com alto título de anticorpos específicos. Ao ser utilizado em RIA, o soro anti-Amm8 apresentou reatividade cruzada com a Amm5, AaH2, e indícios de interação com Lqq5 e Bot3, demonstrando que ao menos uma porção dos anticorpos gerados contra a Amm8 é

capaz de se ligar à estas α -toxinas(MARTIN-EAUCLAIRE ET AL., 2006). Além disso, o soro produzido foi capaz de deslocar a AaH2 já ligada ao seu alvo, em sinaptossomas de cérebro de rato, acelerando a dissociação do complexo. Em experimentos de neutralização *in vivo*, 1ml do soro de coelho produzido foi capaz de neutralizar 10 μ g de AaH2, correspondente a 42 DL50, confirmando o potencial desta molécula para utilização como imunógeno na produção de antivenenos ou até mesmo na geração de vacinas.

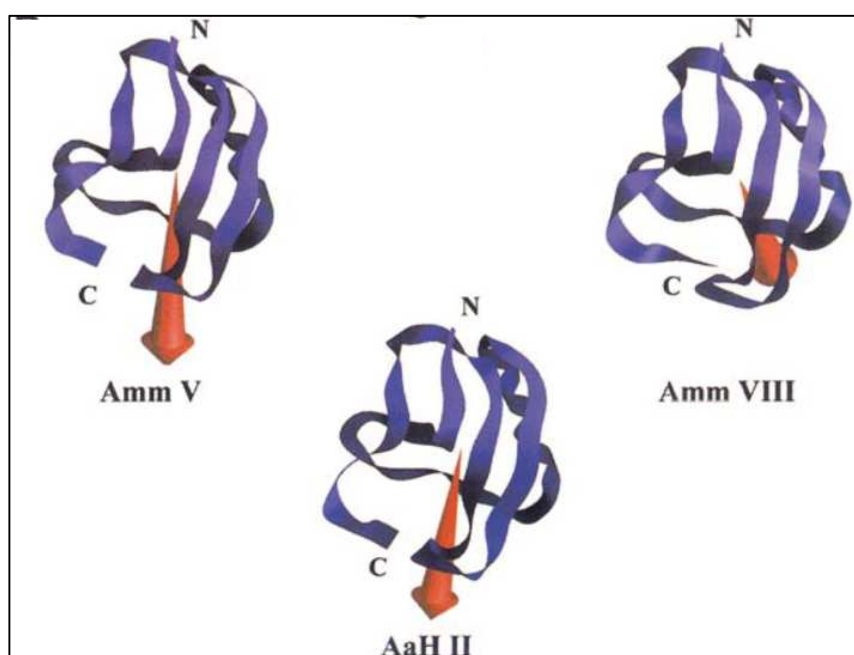


Figura 11: Estrutura tridimensional modelada das toxinas Amm5, Amm8 e AaH2. As setas vermelhas indicam o momento dipolar da molécula, que no caso da Amm8, difere das demais. (ALAMI ET AL.,2003).

1.3.3. AaH2

A toxina 2 do escorpião *Androctonus australis Hector* é uma α -toxina clássica. Foi uma das primeiras toxinas a ser extensivamente estudada, sendo considerada como referência para os estudos subsequentes desta família. Ela apresenta uma das maiores afinidades detectadas para o sítio 3 de canais para sódio voltagem dependente, e é extremamente tóxica, com DL50 de 25 ng/kg por via intracérebroventricular e 11 μ g/kg por via subcutânea, em camundongos.

A AaH2 teve sua sequência peptídica elucidada em 1972, por Rochat e colaboradores e em 1974, Kopeyan já havia descrito a disposição das pontes dissulfeto presentes na molécula, que posteriormente serviriam de modelo para as demais toxinas escorpiônicas de sua classe.

Sua sequência nucleotídica codifica 83 resíduos, sendo que destes, 19 fazem parte de seu peptídeo sinal, conferindo-a uma massa de 7243.20 Da.

VKDGIVDDVNCTYFCGRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHSVTRTKGPGRCHGR

Figura 12: Sequência primária da AaH2. As cisteínas estão destacadas em vermelho.

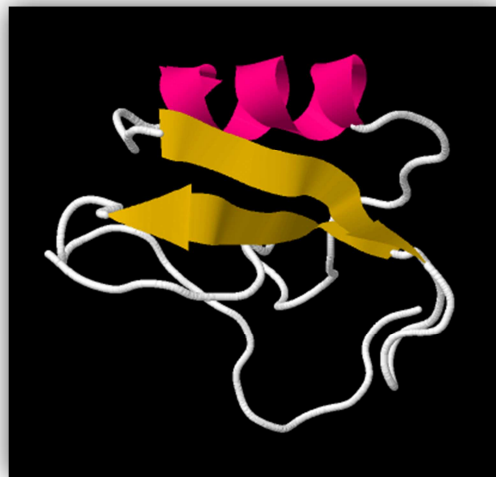


Figura 13: Estrutura tridimensional resolvida da AaH2 (PDB: 1AHO). As fitas β estão mostradas em amarelo e a α -hélice em rosa.

Sua estrutura tridimensional já foi elucidada (FONTECILLA-CAMPS ET AL., 1988) e posteriormente refinada (HOUSSET, 1994), (SMITH, 1997), sendo a primeira representante das α -toxinas escorpiônicas a ter sua estrutura resolvida, confirmando o padrão de estrutura do tipo $\alpha\beta$.

Uma forma recombinante da AaH2 foi produzido a partir de biblioteca de cDNA do telson de *A. australis* (BOUGIS ET AL., 1989). Após a identificação de seu gene, este foi clonado em plasmídio que transfectou células COS-7, de rim de macaco. O análogo

expresso manteve as mesmas propriedades biológicas e imunológicas da molécula nativa.

Outra forma recombinante da AaH2 foi produzida em *E.coli*, em fusão com a MBP. Alterações provocadas neste mutante permitiram a elucidação de alguns resíduos importantes para a atividade da molécula. A amidação da H64 e adição de um resíduo extra, G65, no C-terminal da molécula não prejudicou sua atividade, sendo esta idêntica à forma nativa. Em contraste, a mutação da K58 para resíduos de valina, isoleucina ou ácido glutâmico drasticamente reduziu a atividade da toxina (LEGROS ET AL., 2005).

A literatura a respeito da caracterização imunoquímica desta proteína é extensa, porém ainda não conclusiva. El Ayeb e colaboradores, em 1986, purificaram 5 populações distintas de anticorpos dirigidos contra a AaH2 e utilizou-as para estudar a interação da toxina com seu receptor no canal para sódio. Foram identificadas duas regiões antigênicas: uma próxima a região da ponte dissulfeto 12-63 e uma ao redor dos resíduos 50-59, que parecem estar envolvidas no mecanismo de neutralização, uma vez que a ligação de anticorpos específicos para estas porções impediram a ligação da toxina no canal.

Granier, em 1989, compilou os dados existentes na literatura e, à luz na então recém-elucidada estrutura da AaH2, identificou que as regiões antigênicas até então mapeadas estariam localizadas em partes expostas da molécula, principalmente nos loops e parte da α -hélice.

Peptídeos sintéticos cobrindo toda a sequência da AaH2 foram utilizados para mapear possíveis epitopos lineares da AaH2 e testados com 5 soro de coelhos anti-AaH2. Seis regiões reativas foram identificadas: aa 1-8, 4-12, 27-35, 39-45, 52-58 e 55-61 (DEVAUX ET AL., 1993).

A porção N-terminal, que se mostrou a mais reativa no trabalho citado acima, em sua forma sintética solúvel, acoplada a um carreador, foi capaz de incitar a produção de anticorpos em coelhos que, além de neutralizar os efeitos tóxicos da AaH2, apresentaram reação cruzada com outras toxinas derivadas de escorpiões do

chamado “Velho Mundo”. O soro não foi, contudo, capaz de reconhecer toxinas derivadas dos escorpiões do gênero *Tityus e Centruroides*, oriundos do “Novo Mundo” (DEVAUX ET AL., 1996).

Um anticorpo monoclonal de alta potência, capaz de neutralizar 32.000 DL50 da AaH2 por mg de imunoglobulina purificada, mAb 4C1, foi desenvolvido contra esta toxina (BAHRAOUI ET AL., 1988). Algumas tentativas de mapear o epítipo deste anticorpo foram feitas, revelando tratar-se de epítipo do tipo descontínuo, uma vez que não foi possível observar a ligação deste anticorpo com peptídeos lineares derivados da sequência da AaH2. Uma série de modificações de aminoácidos demonstrou um papel importante para a Lys58 para a interação mAb 4C1-AaH2, uma vez que sua biotinylação inibiu fortemente a ligação do par. Outros monoclonais já foram desenvolvidos contra a AaH2, utilizando um análogo não tóxico desta proteína, porém estes anticorpos apresentaram menor poder neutralizante (DEVAUX ET AL., 1997).

Derivados do mAb 4C1 foram gerados e reproduziram suas propriedades neutralizantes. A região variável desse anticorpo foi clonada a partir do cDNA dos hibridomas e foram expressos como cadeia única, scFV. Esses fragmentos são interessantes por serem menos imunogênicos e se difundirem com mais facilidade quando inoculados. Este fragmento foi ligado em tandem com outra scFV derivada do monoclonal 9C2, dirigido contra a toxina AaH1, gerando uma molécula biespecífica, capaz de proteger animais do envenenamento (JUSTE ET AL., 2007).

1.3.4. Ts3

A Ts3 é uma toxina do tipo α clássica, presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Ts3 foi a primeira toxina purificada a partir do veneno bruto de *T. serrulatus* (COUTINHO-NETO, 1975). Algumas nomenclaturas foram anteriormente utilizadas para se referir a esta mesma toxina, como TsTX, Tityustoxin, TsIV-5, Ts IV, alpha-toxin, Toxin-4, Tityustoxin IV, Ts III e Toxin-3 (COLOGNA ET AL., 2009). Neste trabalho, utilizaremos a nomenclatura recomendada por (KING ET AL., 2008).

KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWVHILCYCYGLPDSEPTKTNGKCKS

Figura 14: Sequência primária da Ts3. As cisteínas estão destacadas em vermelho.

Sua sequência nucleotídica contém 80 resíduos, sendo que destes, 13 fazem parte de seu peptídeo sinal. Além disso, os últimos três aminoácidos da sequência são processados após a tradução. Sua sequência madura possui 64 aminoácidos (MARTIN-EAUCLAIRE ET AL., 1994), peso molecular de 7447.42 Da (PIMENTA ET AL., 2001) e suas cisteínas formam 4 pontes dissulfeto, caracterizando-a também como membro da superfamília de toxinas escorpiônicas longas de 4 C-C. Seguindo o padrão das toxinas para canais para sódio voltagem-dependente, possui estruturas secundárias $\beta\alpha\beta\beta$ interconectada por loops variáveis. Sua estrutura terciária ainda não foi determinada, mas devido a similaridades de sequências e a conservação observada para toxinas escorpiônicas para canais para sódio voltagem-dependente, através de ferramentas de Bioinformática, a estrutura teórica da Ts3 pode ser modelada com certa confiabilidade.

Um mecanismo de ação da Ts3 em canais para sódio voltagem-dependente foi proposto pelo grupo do Prof. Paulo Sérgio Beirão, que publicou uma série de trabalhos nessa linha (CAMPOS ET AL., 2004), (CAMPOS ET AL., 2006), (CAMPOS ET AL., 2008). O grupo sugere um modelo cinético no qual os canais para sódio voltagem-dependente possuiriam duas conformações diferentes para seu estado aberto: uma conformação na qual o processo de inativação procederia de maneira lenta (O1) e outra a partir da qual a inativação ocorreria rapidamente (O2). Ao se ligar no sítio 3 do canal para sódio voltagem-dependente, a Ts3 bloquearia o movimento do segmento S4 do domínio IV, que atua como o sensor de voltagem do canal, travando a sua transição para o estado aberto de inativação rápida (O2). Desta maneira, a inativação normal do canal seria prejudicada, podendo ocorrer apenas a partir da conformação que gera inativação lenta (O1), aumentando o tempo em que o canal permanece aberto.

Ao ser inoculada em mamíferos, a Ts3 provoca a liberação de neurotransmissores como catecolaminas e acetilcolina (LIMA & FREIRE-MAIA, 1977), (GOMEZ ET AL., 1995), (CLEMENTE ET AL., 2002) e também afeta a liberação de GABA, glutamato e aspartato tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MASSENSINI ET AL., 1998).

A Ts3 é capaz de causar relaxamento em preparações pré-contraídas de corpo cavernoso humano, através da liberação de NO de nervos nitrérgicos. Este efeito foi inibido pela tetrodotoxina e potencializado pelo inibidor de fosfodiesterase 5, Sildenafil. Esta propriedade da Ts3 sugere que ela seria aparentemente a responsável pelo priapismo observado em alguns casos de envenenamento. Essa propriedade faz dela um importante alvo de estudo tanto para o entendimento e tratamento do priapismo no envenenamento, quanto para o desenvolvimento de fármacos para tratamento da disfunção erétil, através da modulação de canais para sódio voltagem-dependente (TEIXEIRA ET AL., 2004).

A Ts3 é a toxina mais potente do veneno de *T.serrulatus* quando injetada por via subcutânea, a via natural de inoculação do veneno pelo escorpião (DE LIMA ET AL., 1986), sendo um alvo importante para estudos imunoquímicos que visam a neutralização do veneno de *T.serrulatus*. Alguns trabalhos do nosso grupo mapearam os epitopos lineares desta toxina com diferentes soros, através da técnica de SPOT (ALVARENGA ET AL., 2002), (MACHADO-DE-ÁVILA ET AL., 2004), (MARIA, 2005).

O mapeamento de epitopos lineares da Ts3 a partir de soro de coelho imunizado com Ts3 purificada foi realizado por Alvarenga e colaboradores, em 2002, através da técnica de SPOT. A região C-terminal apresentou maior reatividade, e o peptídeo composto pelos resíduos 50 a 64 (LPDSEPTKTNGKCKS) foi sintetizado e utilizado para imunizar coelhos, juntamente com outros peptídeos provenientes da TsNTxP. O soro anti-peptídeo produzido se mostrou capaz de neutralizar eficientemente a fração tóxica do veneno de *T.serrulatus* (13,5 DL50 da fração tóxica neutralizadas por 1 ml de soro anti-peptídeo).

A imunização de camundongos Balb/c e C57/bl10 com a fração tóxica do veneno de *T.serrulatus* (TsFG50), detoxificada pela sua conjugação com albumina bovina via glutaraldeído, foi realizada por Machado e colaboradores em 2004. Os camundongos imunizados foram capazes de resistir a um desafio com uma dose correspondente a 2 DL50 da própria TsFG50 e esse efeito protetor persistiu até 9 semanas após a última dose dada aos animais. Os anticorpos potencialmente neutralizantes, presentes no soro dos animais imunizados, tiveram seus epitopos

lineares caracterizados pela técnica de SPOT, utilizando as sequências das toxinas Ts1, Ts2 e Ts3. Tanto o soro dos camundongos Balb/c quanto de C57/bl10, apesar de apresentarem títulos de anticorpos diferentes, reagiram com os mesmos spots, correspondentes a uma região central da Ts3 (WNYDNAYCDKLCCK) e com a sua porção C-terminal (GLPDSEPTKTNGKCK).

Um estudo de mapeamento de epitopos lineares da Ts3, bem como de outras toxinas de *T. serrulatus*, semelhante foi realizado por Maria e colaboradores, porém utilizando soros de cavalo hiperimunizados apresentando diferentes potências neutralizantes, na tentativa de relacionar o poder de neutralização dos soros com determinados epitopos. Uma vez estabelecida tal correlação, seria possível substituir os testes de potência na produção comercial de antivenenos que, em sua forma atualmente utilizada, implica no sacrifício que um grande número de animais. Infelizmente, o estudo não foi capaz de estabelecer uma correlação satisfatória entre potência e epitopos determinados. Entretanto, foi possível mapear algumas regiões reativas na porção N-terminal (KKDGYVVEYDMCAYI), central (WNYDNAYCDKLCCK) e C-terminal (GLPDSEPTKTNGKCK) da Ts3, sendo os dois últimos idênticos às regiões mapeadas no trabalho de Machado em 2004. As duas primeiras regiões demonstraram uma tendência a serem mais reativos em soros de alta potência, apesar de correlação estatística não ter sido estabelecida.

A forma recombinante de Ts3 foi produzida pelo grupo do Prof. Evanguedes Kalapothakis, sendo dissertação de mestrado de Anderson Oliveira do Carmo (2011). O gene da Ts3 já havia sido anteriormente clonado a partir do cDNA por Corona et al., 1996, revelando a presença de um íntron, interrompendo a região codificadora. A sequência nucleotídica da Ts3 madura foi amplificada e clonada nos vetores de expressão bacteriana pET26b. Após a clonagem, o vetor pET26/Ts3 foi expresso em *E. coli* Origami-DE3e. A proteína produzida, Ts3r foi purificada em coluna de níquel e foi testada em injeção subcutânea em camundongos, porém não apresentou nenhuma atividade farmacológica. A Ts3r foi então utilizada para imunizar coelhos. Mesmo após seis doses, apesar de apresentar reatividade por ELISA contra o veneno total, o soro produzido não foi capaz de neutralizar o veneno de *T. serrulatus*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Mapear e caracterizar epitopos descontínuos de toxinas para canais para sódio e de anatoxinas que induzem a resposta de anticorpos capazes de neutralizar o veneno de escorpiões de importância médica no Brasil e no mundo.

2.2. Específicos

2.2.1. Mapear possíveis epitopos descontínuos da TsNTxP (*Tityus serrulatus*), pela construção de diepitopos em membrana de SPOT, segundo modificação proposta por (REINEKE ET AL., 2000).

2.2.2. Predizer possíveis regiões epitópicas a partir da estrutura resolvida ou modelada das seguintes proteínas: Ts3 (*Tityus serrulatus*); Amm8 (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*); e AaH2 (*Androctonus australis*) utilizando a ferramenta de bioinformática PEPOP.

2.2.3. Desenhar peptídeos que mimetizem as possíveis regiões epitópicas preditas nas proteínas escorpiônicas citadas, utilizando o PEPOP.

2.2.4. Sintetizar os peptídeos desenhados em membranas pela técnica de SPOT.

2.2.5. Testar as membranas com anticorpos neutralizantes dos venenos cognatos para a identificação de epitopos.

2.2.6. Sintetizar os epitopos identificados por síntese química de peptídeos em fase sólida.

2.2.7. Caracterizar os epitopos antigenicamente e imunogenicamente;

2.2.8. Verificar o potencial de neutralização *in vivo* em animais imunizados com os epitopos sintéticos.

2.2.9. Verificar o potencial de neutralização *in vitro* do soro dos animais imunizados com os epítopos sintéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Proteínas escorpiônicas mapeadas

Para o mapeamento de epitopos conformacionais, foram escolhidas proteínas do veneno de escorpiões de maior relevância médica no Norte da África e no Brasil. As proteínas escolhidas foram aquelas responsáveis pela maior parte da toxicidade do veneno (AaH2 e Ts3) e aquelas que, apesar de não tóxicas para mamíferos, apresentaram potencial para desenvolver anticorpos neutralizantes contra o veneno total (Amm8 e TsNTxP).

As estruturas primárias das proteínas escolhidas foram obtidas a partir do banco de dados UniProtKB (AaH2 - P01484; Amm8 - Q7YXD3; TsNTxP - O77463; Ts3 - P01496)

A estrutura terciária da AaH2 foi obtida no PDB (1AHO). Para as proteínas que não possuíam suas estruturas tridimensionais resolvidas, foi feita a modelagem por homologia. O modelo para a proteína Amm8 foi criado a partir da estrutura resolvida da AaH2 citada acima e os modelos para as proteínas TsNTxP e Ts3 foram criados a partir da estrutura resolvida da Ts1 (PDB: 1NPI). A modelagem foi feita utilizando o software Modeller 8v1 (SALI & BLUNDEL, 1993).

3.2. Purificação da Ts3

3.2.1. Gel Filtração em Coluna Sephadex G50

A separação do veneno de *Tityus serrulatus* foi realizada manualmente. Foram dissolvidos 100 mg do veneno em 2,5 ml de ácido acético a 30% e centrifugado a 15.000G por 30 minutos a 4 graus. O sobrenadante foi recuperado e injetado em uma coluna de Sephadex G50 (1m x 2,5 cm). Como eluente, foi utilizada uma solução de ácido acético 0,1M a um fluxo de 20 ml por hora. Foram coletadas frações de 6ml e a detecção dos picos foi feita pela leitura da absorbância a 280nm das frações coletadas

3.2.2. Fase Reversa em Coluna C18

Para a separação das toxinas presentes na fração tóxica purificada por gel filtração em Sephadex G50, foi feita uma cromatografia de fase reversa em coluna C18. Foram aplicados 400 µg do pico II da gel filtração. Após lavagem da coluna com água – TFA 1%, foi feito um gradiente de 20% de acetonitrila até 80% em 60 minutos. O fluxo utilizado foi de 1ml/min e a detecção dos picos foi feita a 216nm. Os picos coletados manualmente e foram posteriormente analisados em espectrometria de massa.

3.3. Predição de epitopos conformacionais

3.3.1. Diepitopos

Para simular porções descontínuas da molécula da TsNTxP, peptídeos compostos por sequências contínuas de oito resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da molécula foram combinados a sequências também contínuas de oito resíduos da porção C-terminal. Foram adicionadas duas glicinas como espaçadores entre cada porção, gerando peptídeos de fórmula geral (P1)-Gly-Gly-(P2), onde P1 representa um octapeptídeo da porção N-terminal e P2 um octapeptídeo da porção C-terminal. Para cobrir toda a sequência da TsNTxP, as sequências das porções P1 e P2 foram sistematicamente deslocadas em três resíduos e combinadas entre si, de modo a gerar todas as combinações possíveis entre P1 e P2. Foram geradas 153 combinações diferentes no total (Tabela 2).

3.3.2. Bioinformática

3.3.2.1. PEPOP

Para a predição por bioinformática de epitopos conformacionais, foi utilizado o programa PEPOP (MOREAU ET AL., 2008). O algoritmo utilizado pelo programa é capaz de identificar segmentos de aminoácidos contíguos que sejam acessíveis ao solvente, a partir da estrutura tridimensional resolvida ou modelada de uma proteína. Esses segmentos identificados são agrupados de acordo com uma matriz de distância e também avaliados quanto a características físico-químicas comumente presentes em

interações proteína-proteína, como hidrofobicidade, presença de aminoácidos específicos e presença de voltas β .

O programa PEPOP oferece uma ferramenta para o desenho de peptídeos que possam representar as potenciais regiões epitópicas preditas a partir dos segmentos selecionados. Um “segmento de referência” entre os agrupamentos previamente citados é escolhido e outros segmentos são adicionados a ele para a formação de uma sequência peptídica. O usuário do programa pode definir a região da proteína que deve ser privilegiada nesse processo, o tamanho do peptídeo a ser criado, bem como diferentes métodos de extensão para criar o peptídeo. Os métodos disponíveis para a geração de peptídeos que mimetizam as possíveis regiões epitópicas conformacionais preditas pelo algoritmo PEPOP, a partir da extensão de segmentos de referência, são enumerados abaixo.

- NEAREST NEIGHBOURS – Ajunta os segmentos mais próximos ao C-terminal do segmento referência (disponível desde o início de 2008).
- OPTIMIZED NEAREST NEIGHBOUR - Ajunta segmentos mais próximos ao C-terminal do segmento referência, mas em uma ordem que faça com que a distância percorrida entre os segmentos seja a menor possível (disponível desde o início de 2008).
- NEAREST FLANKING – Ajunta segmentos tanto do lado C-terminal como do N-terminal do peptídeo de referência, alternadamente (disponível desde o início de 2008).
- OPTIMIZED NEAREST FLANKING - Ajunta segmentos tanto do lado C-terminal como do N-terminal do peptídeo de referência, alternadamente, mas em uma ordem que faça com que a distância percorrida entre os segmentos seja a menor possível (disponível desde o início de 2008).
- RAI0 DE 10 Å – Ajunta segmentos que se encontram num raio de 10 Å do segmento referência, considerando a menor distância entre eles (disponível desde a segunda metade de 2008).

- **ADIÇÃO DE ESPAÇADORES** – Esse método pode ser combinado a qualquer outro método de extensão e consiste na adição de aminoácidos extras entre os segmentos escolhidos para formar o peptídeo, visando mimetizar a distância real entre eles na estrutura tridimensional da proteína. Pode-se adicionar espaçadores seguindo-se duas abordagens diferentes.

ALA-Linkers – Acrescenta alaninas entre os segmentos combinados pelas metodologias citadas anteriormente. O número de alaninas depende da distância entre os segmentos (disponível desde a segunda metade de 2008).

Structural Alfabet (SA) – a partir de uma série de segmentos derivados da estrutura de uma proteína é criado o seu alfabeto estrutural (ETCHEBEST ET AL.,2005), é adicionado um ou mais aminoácidos entre dois segmentos como espaçador. O aminoácido escolhido para ser utilizado como espaçador é aquele que melhor favorecerá a transição e a mimetização da conformação local existente nos segmentos na proteína nativa (disponível desde 2009).

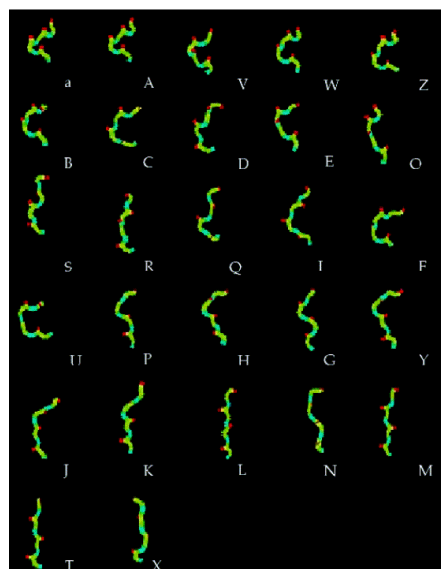


Figura 15: Exemplo de alfabeto estrutural

- **SENTIDO DOS SEGMENTOS** – Nesse método, o sentido dos segmentos (N-term para C-term) não é levado em consideração, sendo que eles podem ser adicionados na

ordem inversa que se encontram na estrutura primária, a fim de aperfeiçoar o mimetismo com a estrutura tridimensional (disponível desde 2009).

- MÉTODO SHP (“*SHORTEST PATH*”): a partir de um grupo (região predita como potencialmente epitópica ou dentro de área com 10Å de raio) de elementos (segmentos ou aminoácidos individuais), um peptídeo é formado pelo menor caminho entre dois elementos, que inclui a maior parte dos elementos presentes (disponível desde 2010).
- MÉTODO TSP (“*TRAVEL SALESMAN PATH*”): a partir de um grupo (região predita como potencialmente epitópica ou dentro de área com 10Å de raio) de elementos (segmentos ou aminoácidos individuais), o algoritmo matemático do “Viajante de Comércio” é utilizado para encontrar caminho ótimo entre os elementos (disponível desde 2010).

3.3.2.2. EPITOPIA

Para prever a probabilidade de exposição de resíduos ao solvente, foi utilizado o servidor Epitopia (RUBINSTEIN ET AL., 2009), destinado a prever a natureza imunogênica de uma proteína. Ele utiliza esquema de aprendizagem do sistema para classificar aminoácidos individuais da proteína de acordo com o seu potencial de gerar resposta imune humoral.

3.4. Validação da predição de epitopos conformacionais por SPOT synthesis

3.4.1. Síntese paralela dos peptídeos preditos

Os peptídeos preditos como potenciais epitopos conformacionais pelas metodologias de diepitopos e bioinformática foram sintetizados em uma membrana de celulose, de acordo com protocolo descrito por Laune et al. 2002. Peptídeos sobrepostos, cobrindo toda a sequência linear das proteínas escolhidas, também foram sintetizados para a verificação da presença de epitopo lineares. A síntese paralela de peptídeos permite a síntese rápida e eficiente de um grande número de peptídeos em delimitações pontuais, definidas pelo volume de deposição de cada

resíduo. Para a síntese, foi utilizado um robô (*Multipep Automatic Spot Synthetizer – Intavis, Alemanha*) para a deposição de um volume de 0,6 µl de cada aminoácido, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana. O plano de distribuição dos aminoácidos bem como a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos foram definidos em programa de computação Multipep.

Inicialmente, a membrana de celulose foi transformada de modo a disponibilizar grupamentos amino para o acoplamento de aminoácidos, através da esterificação de uma Fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc)-βAla-OH às funções hidroxila disponíveis na celulose. Além de tornar o suporte funcional, a adição de um grupamento entre o suporte e o peptídeo tem como objetivo afastar o peptídeo do suporte para garantir sua maior mobilidade e a manutenção da sua conformação.

A síntese dos peptídeos iniciou-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido das sequências estabelecidas para cada ponto. O grupamento protetor Fmoc, que se encontrava acoplado à função amina da βAla-OH, foi retirado pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF). O grupo amino se tornou então disponível para reação com o primeiro aminoácido da sequência desejada a ser acoplado. A eficiência da desproteção pode ser monitorada por reação com azul de bromofenol, que apresenta coloração azul quando em contato com grupamentos amina livres e laranja quando esta função se encontra protegida.

Para a síntese dos peptídeos, foram utilizados aminoácidos contendo sua função amina protegida por um grupamento Fmoc e com as diferentes cadeias laterais de cada aminoácido também bloqueadas devidamente por grupamentos químicos adequados. Ao serem acoplados, os aminoácidos tiveram sua função carboxila previamente ativada por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida / hidroxibenzotriazol). Estes ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. Os aminoácidos ativados foram então depositados em seus pontos específicos sobre a membrana. Para cada aminoácido, foram realizados dois ciclos de acoplamento. As aminas que por ventura permaneceram livres após os ciclos de

acoplamento foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF, a fim de evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados.

Em um próximo ciclo, o grupo protetor FMOC do aminoácido recém-acoplado foi eliminado em meio básico pela piperidina a 20%. A membrana foi lavada com metanol e, após secagem desta, foi iniciado um novo ciclo de acoplamento com o segundo aminoácido. Os ciclos se sucederam desta forma até completar a sequência do peptídeo desejado.

Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos foram retirados pelo tratamento da membrana com ácido trifluoroacético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano.

3.4.2. Imunoensaio

As membranas contendo os peptídeos sintéticos correspondentes aos epitopos conformacionais preditos foram primeiramente testadas contra os anticorpos secundários utilizados para a revelação da reação, de modo a detectar possíveis reações cruzadas. O protocolo foi otimizado individualmente em cada caso, para minimizar reações inespecíficas.

Após estes testes, as membranas foram então utilizadas para a verificação da interação real entre os peptídeos sintetizados e seus anticorpos específicos. Foram utilizados apenas anticorpos capazes de neutralizar a ação tóxica de venenos escorpiônicos.

Para as proteínas dos escorpiões do Norte da África, foram utilizados o anticorpo monoclonal 4C1, dirigido contra a toxina AaH2 (BAHRAOUI ET AL. 1988), e soros de coelho neutralizantes contra a toxina AaH2 e contra a proteína Amm8. Estes soros foram preparados segundo (MARTIN-EAUCLAIRE ET AL., 2006), gentilmente cedidos pela Dra. Marie France Martin-Eauclaire (Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, França) e tiveram ainda seus anticorpos policlonais purificados por cromatografia de afinidade em Sepharose 4B conjugado a proteína A, seguindo-se as

instruções do fabricante (GE Healthcare Life Science). Para as proteínas do escorpião *T.serrulatus*, foram utilizados soros neutralizante de diferentes animais produzido em nosso laboratório segundo (CHAVEZ-OLORTEGUI ET AL., 2001).

Inicialmente, as membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS pH 7.4 e então saturadas em solução contendo 1ml de tampão de bloqueio e 0,5g de sacarose, em 20ml de tampão TBS – Tween 0,1%, overnight. A membrana foi lavada em tampão TBS - Tween 0,1% e incubada com o soro ou anticorpo a ser testado, diluído na mesma solução utilizada na saturação, durante 1h e 30 min á 37°, sob agitação constante. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,01% por 10 min.

3.4.3. Revelação

3.4.3.1. Fosfatase alcalina

O anticorpo secundário ligado á fosfatase alcalina, diluído 1:4000 em tampão de saturação, foi incubado com a membrana por 1h a 37°. Após nova lavagem com TBS – Tween 0,1% e mais duas lavagens com CBS pH, 7 por 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente, foi adicionado o substrato contendo MTT-BCIP (Sigma) e após 20 minutos de revelação os spots reativos foram definidos.

3.4.3.2. ECL

O anticorpo secundário ligado á peroxidase, diluído em tampão de saturação, foi incubado com a membrana por 1h a 37°. Após nova lavagem com TBS – Tween 0,1%,foi utilizado o kit Enhanced Chemiluminescence Immunoblotting (GE), segundo as especificações do fabricante, para a detecção dos spots reativos.

3.4.4. Quantificação

Em ambos os protocolos de revelação, o resultado final foi registrado, escaneando-se ou fotografando a membrana revelada pela fosfatase alcalina ou o filme resultante da relevação por ECL. A imagem gerada foi então analisada utilizando-

se o software ImageJ, que quantifica os pixels presentes em uma área definida pelo usuário.

3.4.5. Regeneração da membrana

Para reutilizações posteriores, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração. Foi feito um tratamento com dimetilformamida (DMF), reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol), reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol), e metanol para remover os complexos moleculares precipitadas sobre os peptídeos (três lavagens de 10 min cada)

3.5. ALA-Scan

Uma vez identificado um peptídeo reativo na membrana, foram determinados os aminoácidos importantes para a ligação peptídeo-anticorpo pela técnica de ALA-Scan. Este ensaio consiste na síntese de uma membrana de SPOT, conforme descrito acima, contendo uma série de peptídeos cuja sequência é derivada da sequência de interesse, sendo cada aminoácido da sequência do peptídeo original substituído por uma alanina. No caso de alaninas presentes na sequência inicial, esta é substituída por uma glicina.

As membranas de ALA-Scan foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima, e os aminoácidos importantes para a interação antígeno-anticorpo foram definidos com aqueles cuja substituição levou a uma redução de 50% da reatividade com o anticorpo testado.

3.6. Síntese química dos epitopos identificados

Foi utilizado o método desenvolvido por Merrifield em 1963. Ele consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal.

Foi utilizada a resina Rink Amide como suporte sólido e aminoácidos com as cadeias laterais protegidas por diferentes grupamentos e o N-terminal protegido por grupamento FMOC. O protocolo utilizado foi semelhante ao utilizado para a síntese em membrana de celulose.

A liberação do peptídeo sintetizado da resina, bem como a clivagem dos grupamentos protetores das cadeias laterais, se deu pelo tratamento com TFA, trietilsilano e etanoditiol. Os peptídeos foram então precipitados com éter etílico resfriado, ressuspensos em água e liofilizados.

Após a síntese, a pureza do peptídeo sintetizado foi atestada por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Quando verificada a presença de muitos picos de massas diferentes da desejada, o peptídeo foi purificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Shimadzu) utilizando um sistema AKTA, utilizando gradiente linear de acetonitrila, de 0-100% em 60 minutos. A massa dos picos obtidos foi novamente confirmada por espectrometria de massas.

3.7. Acoplamento de peptídeos á proteínas imunogênicas

Para a utilização de peptídeos como imunógenos, faz-se necessária a conjugação destes a uma proteína de maior tamanho e imunogenicidade, tendo em vista a maior ativação do sistema imunológico e conseqüentemente, maior resposta contra o peptídeo desejado. Neste trabalho, foram utilizadas duas metodologias diferentes para o acoplamento de peptídeos.

3.7.1. Via glutaraldeído

O método de ligação cruzada por glutaraldeído foi feito em apenas um passo, como previamente descrito (MACHADO-DE-AVILA ET AL., 2004). Esse acoplamento se baseia na propriedade do glutaraldeído de formar ligações cruzadas, através da formação de uma base de Schiff entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais de dois resíduos de lisina presentes em duas espécies diferentes de natureza protéica ou ainda entre os grupos N-terminal dos peptídeos.

Para o acoplamento com albumina bovina (BSA) e ovalbumina (OVA) foi utilizado o mesmo procedimento. Foram diluídos em 1 ml de PBS 10 mg do peptídeo e 0,5 mg de BSA ou OVA. Ao longo de 1h, 1 ml de uma solução de glutaraldeído 1% foi adicionado à solução peptídeo-OVA, a 4°C e sob constante agitação. A reação se processou por mais uma hora nessas condições e então foi adicionado NaBH₄ em quantidade suficiente para estabelecer uma concentração final de 10 mg/ml, a fim de reduzir as bases livres eventualmente não ligadas pelo glutaraldeído. A amostra foi dializada contra PBS diluído 10 vezes.

3.7.2. Via SMCC

KLH (Keyhole limpet hemocyanin) também foi utilizada como proteína para a ligação de peptídeos. Os peptídeos (2 mg de cada um) foram acoplados à proteína, segundo o protocolo descrito por Méry e colaboradores, 1993. A proteína foi pesada, 20 mg, e dissolvida em 2 ml de tampão fosfato 50 mM pH7.4. Em seguida foi acrescentado 200 µl da solução de SMCC (succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) 10 mg/ml, em água. Essa mistura permaneceu em agitação por 60 min a temperatura ambiente. Para separação das proteínas que não foram ativadas pelo SMCC, foi utilizada uma coluna de filtração molecular (Sephadex G-25), equilibrada com PBS-EDTA 10mM, pH 6.0. Foram coletadas 20 frações de 600 µl que foram posteriormente lidas a 280 nm em espectrofotômetro

Foi feito um “pool” das frações contendo a proteína ativada, que correspondem ao primeiro pico detectado pelo espectrofotômetro. Junto a este, foi acrescentada a solução contendo os peptídeos, numa proporção de 1:1, e a mistura permaneceu sob agitação, em temperatura ambiente, por mais 2h. Após este tempo, foi acrescentada uma solução de L-cisteína para bloquear as cisteínas livres, por mais 20 minutos de agitação. A solução foi alíquotada e estocada a -20 °C até seu uso posterior.

3.8. Lipossomos

Outra estratégia utilizada para aumentar a imunogenicidade dos peptídeos para imunização foi o seu encapsulamento em lipossomas. Foi utilizado o protocolo

desenvolvido por Chavez-Olortegui, 1991. Foram dissolvidos 860mg de fosfatidil colina de soja e 347mg de colesterol em clorofórmio. A mistura foi colocada em balão de fundo redondo, previamente limpo com metanol e clorofórmio. O balão foi ligado a um rotavapor, á 30 °C, até que o clorofórmio fosse destilado e um filme lipídico fosse formado na parede do balão. Após a formação do filme, o balão ainda permaneceu no rotavapor por mais 80 minutos. O filme foi ressuspendido em 9 ml de água e vortexado até a sua dissolução completa. O balão foi novamente ligado ao rotavapor e permaneceu mais 30 minutos girando. O lipossoma em água foi transferido para um tubo falcon de 15 ml e sonicado em banho de gelo, por 10 minutos, a 25% de potência.

Cada peptídeo (4,2 mg em 940 µl de PBS) foi adicionado a 2 ml do lipossoma formado e a mistura foi liofilizada. Imediatamente antes de cada imunização, o lipossoma foi reidratado. Adicionou-se 300 µl de água e a mistura foi vortexada por 1 minuto e deixada em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. O procedimento foi repetido utilizando-se 300 µl de PBS e logo após os lipossomas estavam prontos para serem utilizados como imunógenos.

3.9. Imunizações

Camundongos das linhagens Balb/c ou C57/black6 receberam injeções de diferentes imunógenos, conforme a proteína de interesse, diluídos 1:1 em hidróxido de alumínio 16mg/ml ou adjuvante de Freund. A primeira dose foi administrada, via subcutânea, no dia 1. Doses subsequentes foram dadas, via intraperitoneal, nos dias 15, 25 e 32. O sangue foi coletado no dia 42 e doses adicionais foram administradas conforme a necessidade de cada imunógeno.

3.10. ELISA

3.10.1. ELISA direta

Todos os ensaios de ELISA foram feitos seguindo o protocolo definido previamente por Chavez-Olórtegui em 1991, descrito a seguir.

Microplacas de ELISA NUNC Maxisorp (Becton Dickinson France S. A.) ou Falcon, de 96 wells foram sensibilizadas durante a noite a 5°C, com 100µl de uma solução contendo 10 µg/ml do antígeno a ser testado diluído em tampão bicarbonato de sódio 0.02M, pH 9.6. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (0,05% Tween-salina-SL) e bloqueadas com a solução de bloqueio contendo caseína 2% em tampão fosfato 0,05 M, 0,015M NaCl, pH 7.4, por uma hora. As placas foram então novamente lavadas e os anticorpos a serem testados foram diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20) e dispostos na placa, em duplicata. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário respectivo conjugados com a enzima peroxidase (Sigma). A ligação do anticorpo secundário foi inferida pela atividade enzimática, utilizando-se ortofenilenodiamino (OPD) como substrato (0,33 mg/ml em tampão citrato pH 5,2 na presença de 0,04% de água oxigenada). Após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras da absorbância foram feitas a 492nm.

3.10.2. ELISA de competição

Para verificar a afinidade dos peptídeos produzidos com os anticorpos utilizados na sua identificação por SPOT, cada peptídeo foi pré-incubado por 16 horas a 4°C com o anticorpo correspondente. Placas de ELISA foram sensibilizadas com a proteína íntegra, na concentração de 5 µg/ml, em tampão bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6. Após o bloqueio, a mistura do anticorpo com cada um dos peptídeos foi adicionada às placas por 1 hora à 37°C. Como controles, foram utilizados a proteína íntegra também pré-incubada com o anticorpo e o anticorpo pré-incubado sozinho. A revelação se deu de forma semelhante á ELISA direta.

3.11. Ensaios de neutralização

3.11.1. In vivo

Ao final dos esquemas de imunização, os camundongos foram desafiados com doses superiores a 2 DL50 do veneno ou da toxina específica, conforme cada caso, diluídos em 100µl de PBS-BSA 0,1%. As doses foram injetadas por via subcutânea. Os

animais foram observados ininterruptamente por 3 horas, a fim de visualizar o aparecimento de sintomas clássicos do envenenamento por escorpião, e a mortalidade contabilizada após 48h.

3.11.2. *In vitro*

A capacidade neutralizante dos soros dos coelhos imunizados e da ascite de camundongos imunizados foi testada em ensaios de neutralização *in vitro*. Foram incubados por 1h, a 37°C, 200 µl do soro de coelhos imunizados com OVA-peptídeo ou ascite de camundongos imunizados com Ts3 e quantidades de veneno equivalentes a 3DL50 ou 2DL50 injetados via subcutânea em camundongos Balb/c fêmeas pesando em média 20g. Como controle, um grupo recebeu apenas o veneno em PBS-BSA 0,1% e outro grupo recebeu o veneno incubado com soro pré-imune. Os animais foram observados por 3h e a mortalidade contabilizada após 48h.

3.12. *Análises Computacionais*

As análises de hidrofiliidade e ponto isoelétrico foram feitas utilizando ferramentas disponibilizadas no portal ExPASy (<http://expasy.org/proteomics>). Para o pI foi utilizada a ferramenta “Compute pI/MW” e para a análise da hidrofiliidade foi utilizado o algoritmo de Hopp & Woods disponível em “ProtParam” (Gasteiger et al., 2005)

3.12. *Purificação de IgG em coluna de proteína A*

Para a purificação de imunoglobulinas provenientes da ascite de camundongos, a coluna de Proteína A foi equilibrada com 40 volumes de PBS. A ascite foi então adicionado (2 ml) e deixado em contato com a *Sepharose*- Proteína A por 16 horas à 4°C. Após, a coluna foi lavada com 50 volumes de PBS e a IgG purificada foi eluída com tampão glicina 0,1M, pH 2,8 com NaCl 0,15 M. O eluato foi neutralizado com tampão Tris/HCl 1 mol/l pH 8,0 e posteriormente dialisado contra PBS.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. TsNTxP

Na tentativa de mapear epítopos descontínuos que seriam reconhecidos por anticorpos anti-TsNTxP, previamente preparados em nosso laboratório (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, 1997) e com propriedades neutralizantes do veneno de *Tityus serrulatus*, foram sintetizados 153 octadecapeptídeos compostos por dois segmentos distantes na sequência linear da proteína, pelo método de SPOT.

Os peptídeos foram desenhados de modo a apresentarem duas partes P1 e P2, covalentemente ligados por um espaçador contendo duas glicinas. P1 e P2 são derivados de partes distintas da sequência proteica, e foram sistematicamente deslocados em três resíduos para cobrir toda a sequência da TsNTxP (Tab 2).

Os peptídeos desenhados foram então sintetizados em membrana de SPOT e testados em imunoenensaio com soro de coelho policlonal anti-TsNTxP. A figura 16 mostra o padrão de reconhecimento obtido.

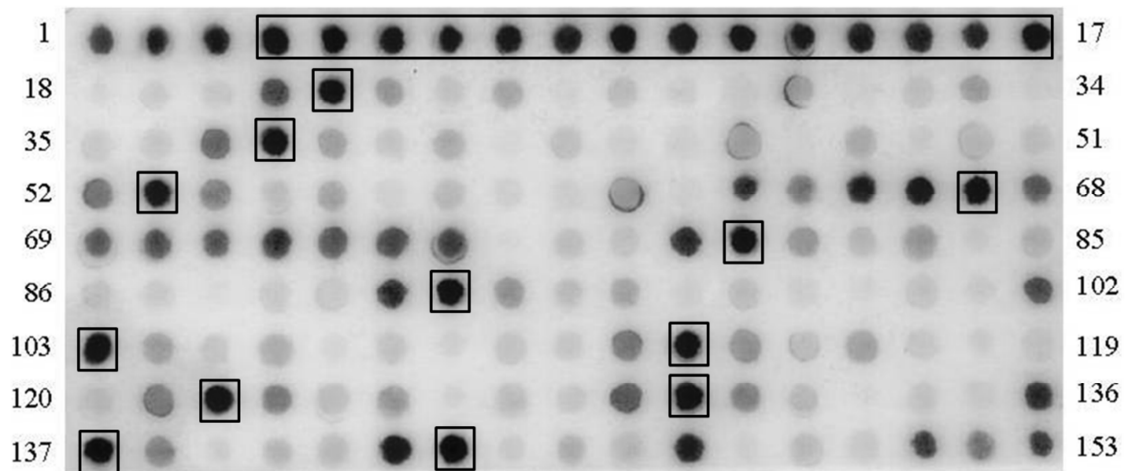


Figura 16: Reatividade dos diepitopos preparados pela técnica de SPOT. Membrana preparada pela técnica de SPOT, contendo os 153 diepitopos derivados da fórmula geral (P1)-(Gly-Gly)-(P2), após reação com soro de coelho anti-TsNTxP de propriedades neutralizantes e revelado a partir de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado á fosfatase alcalina com substrato MTT-BCIP. Os SPOTS de maior reatividade estão destacados.

Tabela 2: Sequências dos peptídeos derivados da TsNTxP, preparados por SPOT. As glicinas utilizadas como espaçadores estão destacadas em vermelho. Os peptídeos controle, contendo sequência irrelevante ASASASAS, estão destacados em azul.

GREGYPADSKGCKITCFLLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSETNKG	GREGYPADSKGCKITCFLLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSETNKG
1 (C) GREGYPAD GG ASASASAS	76 (C) .- CFLTAAGY GG ASASASAS
2.- GREGYPAD GG	77.- CFLTAAGY GG
3.- GREGYPAD GG	78.- CFLTAAGY GG
4.- GREGYPAD GG	79.- CFLTAAGY GG
5.- GREGYPAD GG	80.- CFLTAAGY GG
6.- GREGYPAD GG	81.- CFLTAAGY GG
7.- GREGYPAD GG	82.- CFLTAAGY GG
8.- GREGYPAD GG	83.- CFLTAAGY GG
9.- GREGYPAD GG	84.- CFLTAAGY GG
10.- GREGYPAD GG	85.- CFLTAAGY GG
11.- GREGYPAD GG	86.- CFLTAAGY GG
12.- GREGYPAD GG	87.- CFLTAAGY GG
13.- GREGYPAD GG	88 (C) .- TAAGYCN GG ASASASAS
14.- GREGYPAD GG	89.- TAAGYCN GG
15.- GREGYPAD GG	90.- TAAGYCN GG
16.- GREGYPAD GG	91.- TAAGYCN GG
17.- GREGYPAD GG	92.- TAAGYCN GG
18 GYPADSK GG ASASASAS	93.- TAAGYCN GG
19.- GYPADSK GG	94.- TAAGYCN GG
20.- GYPADSK GG	95.- TAAGYCN GG
21.- GYPADSK GG	96.- TAAGYCN GG
22.- GYPADSK GG	97.- TAAGYCN GG
23.- GYPADSK GG	98.- TAAGYCN GG
24.- GYPADSK GG	99 (C) .- GYCNTECT GG ASASASAS
25.- GYPADSK GG	100.- GYCNTECT GG
26.- GYPADSK GG	101.- GYCNTECT GG
27.- GYPADSK GG	102.- GYCNTECT GG
28.- GYPADSK GG	103.- GYCNTECT GG
29.- GYPADSK GG	104.- GYCNTECT GG
30.- GYPADSK GG	105.- GYCNTECT GG
31.- GYPADSK GG	106.- GYCNTECT GG
32.- GYPADSK GG	107.- GYCNTECT GG
33.- GYPADSK GG	108.- GYCNTECT GG
34 (C) .- ADSKGCKI GG ASASASAS	109 (C) .- NTECTL GG ASASASAS
35.- ADSKGCKI GG	110.- NTECTL GG
36.- ADSKGCKI GG	111.- NTECTL GG
37.- ADSKGCKI GG	112.- NTECTL GG
38.- ADSKGCKI GG	113.- NTECTL GG
39.- ADSKGCKI GG	114.- NTECTL GG
40.- ADSKGCKI GG	115.- NTECTL GG
41.- ADSKGCKI GG	116.- NTECTL GG
42.- ADSKGCKI GG	117.- NTECTL GG
43.- ADSKGCKI GG	118 (C) .- CTLKKGSS GG ASASASAS
44.- ADSKGCKI GG	119.- CTLKKGSS GG
45.- ADSKGCKI GG	120.- CTLKKGSS GG
46.- ADSKGCKI GG	121.- CTLKKGSS GG
47.- ADSKGCKI GG	122.- CTLKKGSS GG
48.- ADSKGCKI GG	123.- CTLKKGSS GG
49 (C) .- KGCKIITCF GG ASASASAS	124.- CTLKKGSS GG
50.- KGCKIITCF GG	125.- CTLKKGSS GG
51.- KGCKIITCF GG	126 (C) .- KKGSSGYC GG ASASASAS
52.- KGCKIITCF GG	127.- KKGSSGYC GG
53.- KGCKIITCF GG	128.- KKGSSGYC GG
54.- KGCKIITCF GG	129.- KKGSSGYC GG
55.- KGCKIITCF GG	130.- KKGSSGYC GG
56.- KGCKIITCF GG	131.- KKGSSGYC GG
57.- KGCKIITCF GG	132.- KKGSSGYC GG
58.- KGCKIITCF GG	133 (C) .- SSGYCAWP GG ASASASAS
59.- KGCKIITCF GG	134.- SSGYCAWP GG
60.- KGCKIITCF GG	135.- SSGYCAWP GG
61.- KGCKIITCF GG	136.- SSGYCAWP GG
62.- KGCKIITCF GG	137.- SSGYCAWP GG
63 (C) .- KIICFLIAG GG ASASASAS	138.- SSGYCAWP GG
64.- KIICFLIAG GG	139 (C) .- YCAWPACY GG ASASASAS
65.- KIICFLIAG GG	140.- YCAWPACY GG
66.- KIICFLIAG GG	141.- YCAWPACY GG
67.- KIICFLIAG GG	142.- YCAWPACY GG
68.- KIICFLIAG GG	143.- YCAWPACY GG
69.- KIICFLIAG GG	144 (C) .- WEACYCY GG ASASASAS
70.- KIICFLIAG GG	145.- WEACYCY GG
71.- KIICFLIAG GG	146.- WEACYCY GG
72.- KIICFLIAG GG	147.- WEACYCY GG
73.- KIICFLIAG GG	148 (C) .- CYCYGLPDS GG ASASASAS
74.- KIICFLIAG GG	149.- CYCYGLPDS GG
75.- KIICFLIAG GG	150.- CYCYGLPDS GG
	151 (C) .- YGLPDSVK GG ASASASAS
	152.- YGLPDSVK GG
	153 (C) .- PDSVKIWT GG ASASASAS

Vários peptídeos foram antígenoicamente reativos com o soro testado. Foi observado que os peptídeos de 4-17, contendo a sequência N-terminal GREGYPAD (resíduos 1-8 da sequência da TsNTxP), e também os spots 22, 38, 53, 67, 80, 92, 103, 122, 130, 137 e 143, contendo a sequência GLPDSVKI (resíduos 46-54 da TsNTxP) no seu C-terminal, foram os peptídeos mais reativos. Peptídeos 1 e 153, que contém

respectivamente as sequências GREGYPAD e GLPDSVKI, porém combinadas com a sequência irrelevante ASASASAS, apresentaram reatividade consideravelmente menor.

Tabela 3: Lista das sequências dos spots que apresentaram maior reatividade frente ao soro de coelho anti-TsNTxP. O spot 5 em destaque foi o que apresentou maior reatividade.

# SPOT	Sequência	Intensidade
1	GREGYPADGGASASASAS	108
2	GREGYPADGGTSETNKCG	122
3	GREGYPADGGKIWTSETN	109
4	GREGYPADGGDSVKIWTS	127
5	GREGYPADGGGLPDSVKI	156
6	GREGYPADGGYCYGLPDS	113
7	GREGYPADGGPACYCYGL	102
8	GREGYPADGGCAWPACYC	100
10	GREGYPADGGKGSSGYCA	132
12	GREGYPADGGTECTLKKG	114
13	GREGYPADGGYCNTECTL	129
14	GREGYPADGGAAGYCNT	120
16	GREGYPADGGITCFLTA	119
17	GREGYPADGGGCKITCFL	151
22	GYPADSKGGGLPDSVKI	119
38	ADSKGCKIGGGLPDSVKI	117
53	KGCKITCFGGGLPDSVKI	106
67	KITCFLTAGGGLPDSVKI	141
79	CFLTAAGYGGGLPDSVKI	133
92	TAAGYCNTGGGLPDSVKI	108
103	GYCNTCTGGGLPDSVKI	126
113	NTECTLKKGGGLPDSVKI	96
122	CTLKKGSSGGGLPDSVKI	97
130	KGSSGYCGGGLPDSVKI	98
137	SSGYCAWPGGGLPDSVKI	113
143	YCAWPACYGGGLPDSVKI	125

A qualidade do peptídeo sintetizado e do imunógeno produzido foi verificada por ELISA (Figura 17 e Figura 18). Ligado à placa de ELISA, o peptídeo produzido foi reconhecido por anticorpos anti-veneno total de *T.serrulatus* e anti-TsNTxP, indicando que o repertório de anticorpos contra esses dois antígenos complexos contém um

grupo de imunoglobulinas que reconhecem especificamente este epitopo descontínuo. Mesmo ao ser acoplado à OVA, o peptídeo manteve estas características.

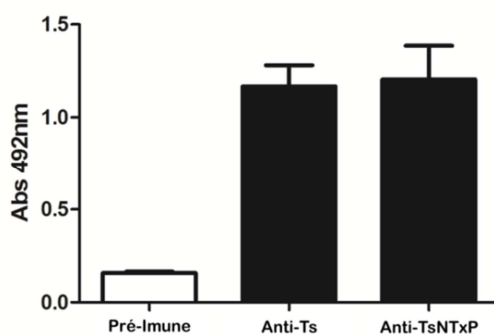


Figura 17: *Reatividade, medida por ELISA, do diepitopo com soros de coelho anti-Ts, anti-TsNTxP e pré-imune.* A placa foi sensibilizada com 100 µl de solução contendo 10 µg/ml de peptídeo sintético. Os soros foram diluídos 1:100.

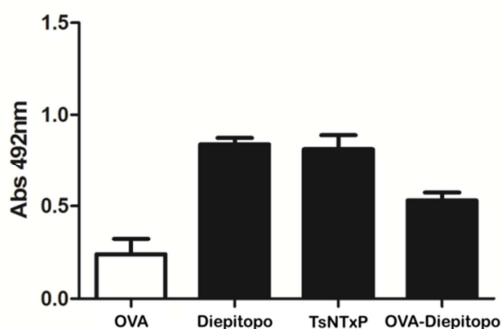


Figura 18: *Reatividade, medida por ELISA, do imunógeno OVA-diepitopo com o soro de coelho anti-TsNTxP.* A placa foi sensibilizada com 100 µl de solução contendo 10 µg/ml de OVA-Diepitopo, somente Diepitopo, somente OVA como controle negativo diluído 1:100.

A habilidade do imunógeno produzido (GREGYPADGGGLPDSVKI-Ovalbumina) de incitar uma resposta imune protetora dos efeitos tóxicos do veneno de *T.serrulatus*, foi avaliada em camundongos BALB/c. O protocolo de imunização utilizou 100µg de imunógeno por animal em todas as doses. Uma e nove semanas após a 4ª dose, o soro dos camundongos foi individualmente coletado e testado por ELISA para a verificação da produção de anticorpos anti-peptídeo (Figuras 19 e 20).

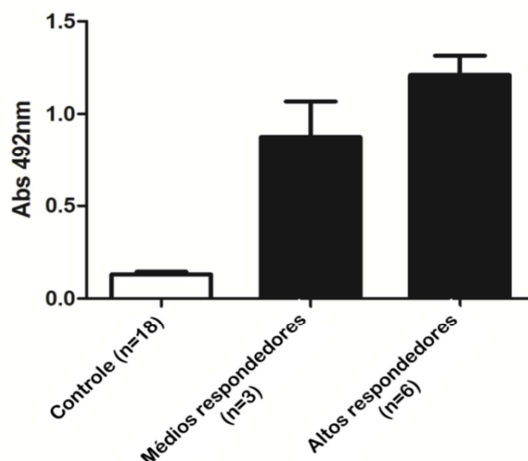


Figura 19: Resposta, medida por ELISA, dos camundongos individuais à imunização com OVA-Diepitopo. A placa foi sensibilizada com 100 µl de solução contendo 10 µg/ml de peptídeo sintético. Os soros foram diluídos 1:100. Os valores de absorbância foram utilizados para agrupar os animais em médios respondedores (entre 0.5-1.0 AU) e altos respondedores (>1.0 AU).

A figura 19 mostra que a reatividade dos soros obtidos dos camundongos imunizados apresentam imunoreatividade consistente com o peptídeo utilizado para sensibilizar a placa, enquanto o soro pré-imune dos camundongos não.

A reatividade de anticorpos anti-peptídeo demonstrou ser persistente, uma vez que nove semanas após a última dose de imunógeno recebida, ainda foi possível detectar reatividade do soro com o peptídeo (Figura 20).

A reatividade cruzada do soro anti-peptídeo com a fração tóxica do veneno de *T.serrulatus* (TsFG50), também foi medida por ELISA (figura 21). Foi possível observar reação contra esta fração, indicando que ao menos uma subpopulação dos anticorpos anti-peptídeo são capazes de se ligar às toxinas do veneno. Os peptídeos controle produzidos também foram testados com os anticorpos anti-peptídeo, não sendo possível detectar reação contra eles, indicando que o soro produzido é de fato dirigido à combinação das duas partes, N-terminal e C-terminal, do peptídeo, combinados como um epítipo único, e não como a somatória da reatividade existente contra as duas porções independentes.

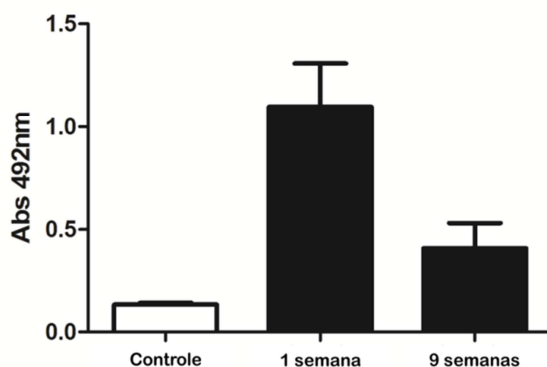


Figura 20: Reatividade, medida por ELISA, dos pools de soro de camundongos imunizados com OVA-Diepitopo ou controle. O soro foi coletado 1 semana (n=9) ou 9 semanas (n=3) após a última injeção. A placa foi sensibilizada com 100 μ l de solução contendo 10 μ g/ml de peptídeo sintético. Os soros foram diluídos 1:100.

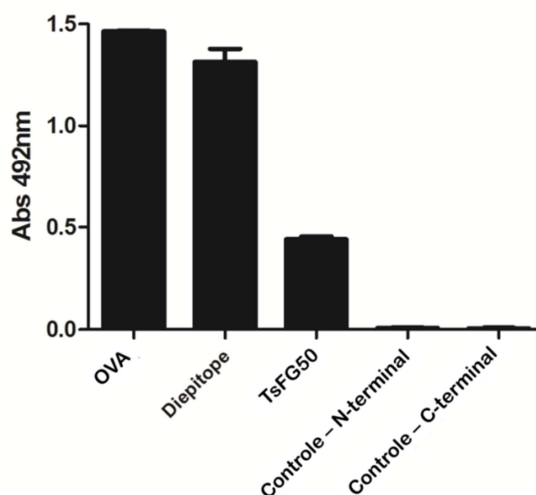


Figura 21: Reatividade, medida por ELISA, do soro de camundongo anti-OVA-Diepitopo frente à fração tóxica do veneno de *T.serrulatus* (TsFG50). A placa foi sensibilizada com 100 μ l de solução contendo 10 μ g/ml de OVA ou de Diepitope, como controles positivos, TsFG50, e ainda peptídeos controle contendo apenas o N-terminal ou C-terminal da sequência do Diepitope, acrescidos de uma sequência irrelevante de alaninas e serinas intercaladas. O soro foi diluído 1:100.

A capacidade dos anticorpos circulantes no soro dos animais vacinados de neutralizar o veneno solúvel de *T.serrulatus* foi determinada em ensaio de neutralização *in vivo* (tabela 4). Um grupo de camundongos foi desafiado com 35 µg do veneno e outro com 42 µg, dosagens essas que correspondem respectivamente á 2,3 e 2,8 DL50 do veneno, conforme estabelecido em ensaio anterior.

Tabela 4: Experimento de proteção in vivo. Uma semana após a última dose, grupos de 6 animais de cada grupo, controle e imunizado com OVA-diepitopo, foram selecionados randomicamente e desafiados.

Grupos	Desafio (2.3 LD50 de Ts)		Desafio (2.8 LD50 de Ts)	
	Taxa de mortalidade	%	Taxa de mortalidade	%
Imunizados	0/2	0	2/4	50
Controle	2/2	100	4/4	100

No primeiro grupo, os dois animais desafiados resistiram ao desafio. Quando a dose maior foi injetada, 50% (2/4) dos animais do segundo grupo sobreviveram ao desafio. Todos os animais controle morreram com ambas as doses testadas. Este resultado demonstra que uma proteção completa contra desafio com dose letal (mais de 1,75 LD100) foi obtida pela imunização com o peptídeo GREGYPADGGGLPDSVKI conjugado à OVA.

Na tentativa de explicar a capacidade observada do peptídeo de induzir anticorpos capazes de neutralizar uma mistura complexa de proteínas tóxicas, a sequência da TsNTxP foi alinhada com as principais toxinas do veneno de *T.serrulatus*. (figura 22)

Considerando-se apenas as duas regiões de interesse, uma identidade de 50% com a Ts2, 56% com a Ts1 e 50% com a Ts3 foram obtidas (similaridade de 81%, 75% e 69%, respectivamente). Na região N-terminal, uma sequência consenso R/K-E/D-G-Y-X-X-D/E foi observada. Na porção C-terminal, um motivo G-L/V-D/N esteve presente em todas as sequências alinhadas. A existência de similaridades entre os resíduos antigênicos do epitopo e as principais toxinas do veneno pode explicar a capacidade

dos anticorpos anti-peptídeos de neutralizar *in vivo* o efeito letal. A reatividade cruzada do soro anti-peptídeo com as toxinas individualizadas não foi demonstrada, devido à escassez de amostras purificadas. Entretanto, por serem essas toxinas os principais componentes da TsFG50 já testada, seriaprovável o reconhecimento das mesmas pelo soro anti-peptídeo.

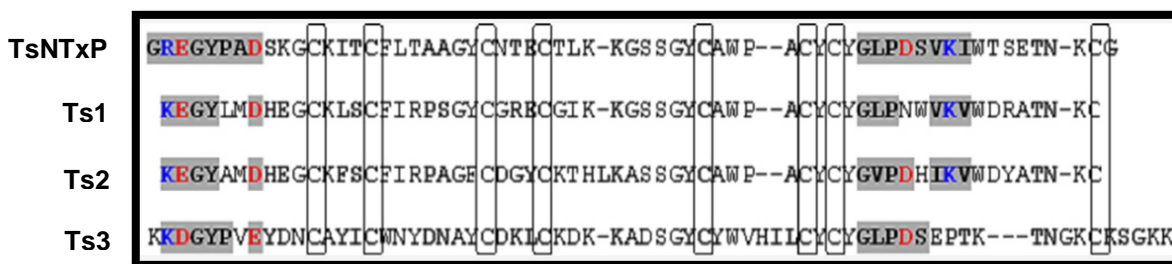


Figura 22: Alinhamento da sequência da TsNTxP com as principais toxinas de *T.serrulatus*. As regiões correspondentes ao diepitopo estão destacadas em cinza. Aminoácidos carregados estão destacados em vermelho (negativos) e azul (positivos).

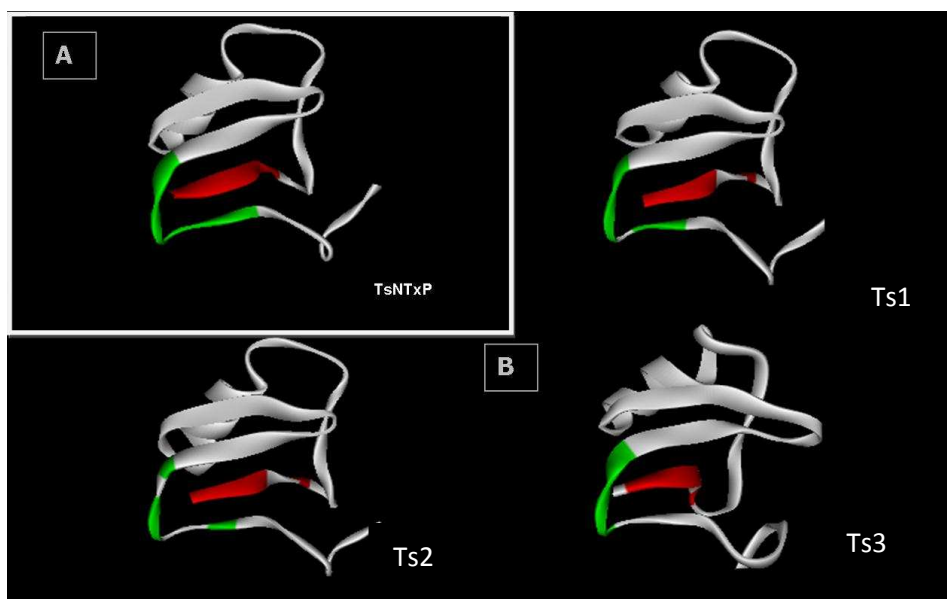


Figura 23: Localização espacial do diepitopo na superfície da TsNTxP e das toxinas relacionadas de *T.serrulatus*. (A) Localização do diepitopo na estrutura modelada da TsNTxP. A localização da porção N-terminal do diepitopo está marcada em verde e a porção C-terminal está em vermelho. (B) Estruturas das principais toxinas de *T.serrulatus*. Aminoácidos semelhantes áqueles que compõem o diepitopo estão demonstrados no contexto tridimensional das principais toxinas de *T.serrulatus*.

A localização dos dois segmentos constituintes do epitopo descontínuo GREGYPADGGGLPDSVKI no contexto tridimensional da estrutura tridimensional foi esclarecedora. As duas partes do peptídeo descontínuo foram posicionadas em modelo derivado da estrutura 3D elucidada da Ts1 e em modelos feitos a partir dessa estrutura para a Ts2, Ts3 e TsNTxP (figura 23).

Foi prontamente verificado que as duas partes do epitopo identificado, embora bastante distanciadas na estrutura primária da proteína, se encontram próximas na estrutura tridimensional da TsNTxP e constituem um microdomínio similar na superfície de todas as principais toxinas.

Além do modelo, dados de predição bioinformática utilizando a ferramenta EPITOPIA (RUBINSTEIN ET AL., 2009) demonstraram que a maioria dos resíduos componentes do epitopo identificado se encontram provavelmente expostos ao solvente, especialmente a região N-terminal e os resíduos V e K da porção C-terminal, o que é essencial para a imunogenicidade do peptídeo (figura 24).

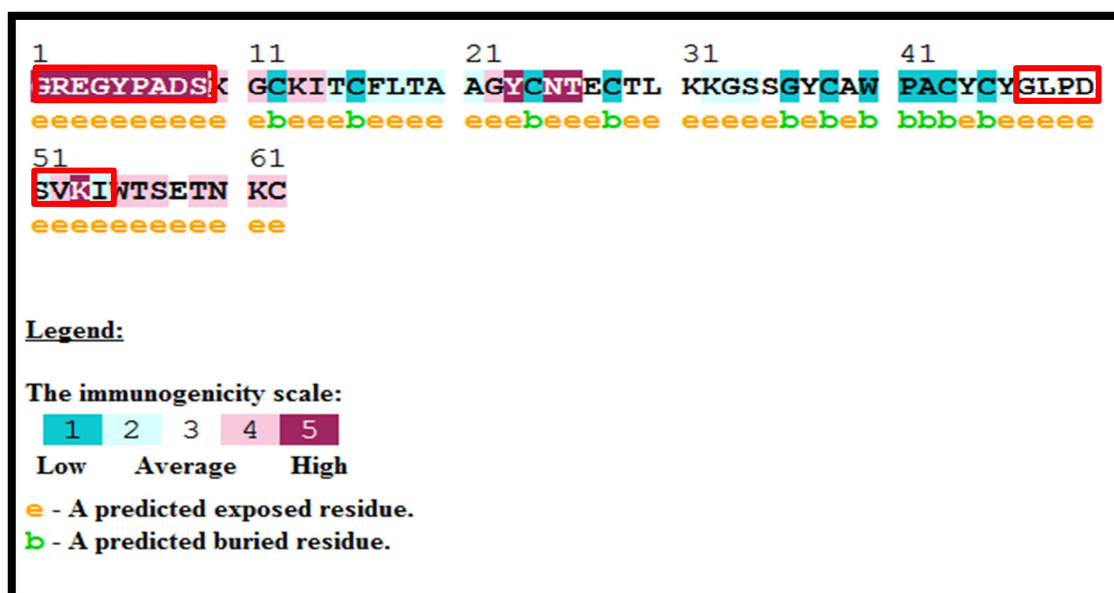


Figura 24: Predição da imunogenicidade da TsNTxP feita por EPITOPIA. Os resíduos componentes do diepitopo estão destacados em vermelho.

De fato, medindo-se as distâncias entre os C α dos resíduos componentes do epitopo identificados e calculando a distância média entre eles, um valor de 8.37 ± 4.9 Å, compatível com o valor médio de 8 ± 1.7 Å para áreas de interações proteína-proteína (CHAKRABARTI ET AL., 2002). Estes resultados sugerem que as porções N-terminal e C-terminal constituiriam um sítio único de reconhecimento antigênico (figura 25).

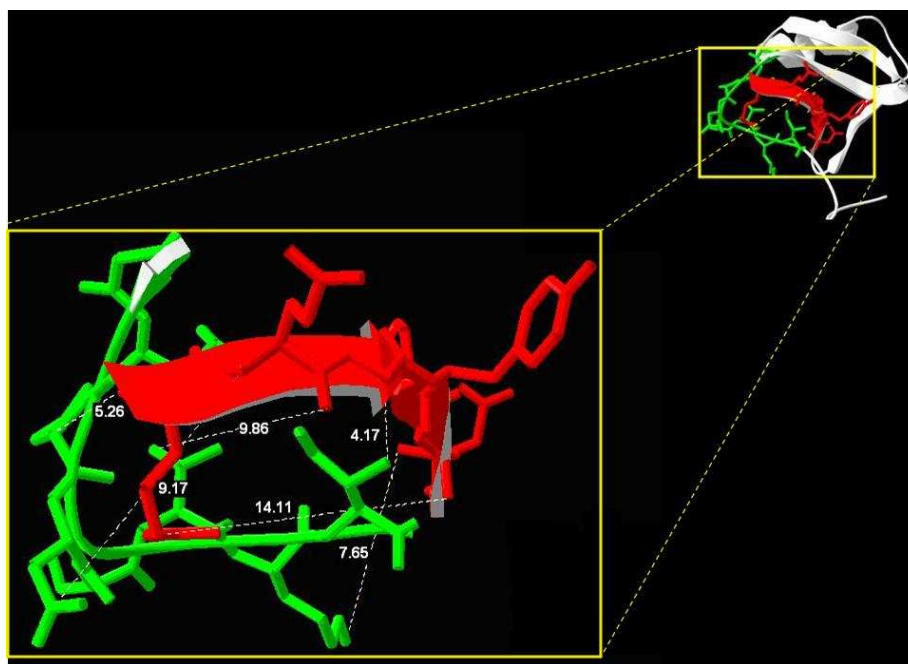


Figura 25: Modelo da sobreposição do diepitopo na estrutura da TsNTxP e as medidas do mesmo para o reconhecimento do sítio por anticorpos. As medidas foram feitas entre os C α dos resíduos do diepitopo. As medidas foram obtidas no programa DeepView Swiss PDB Viewer. A localização da porção N-terminal do diepitopo está marcada em verde e a porção C-terminal está em vermelho.

Para verificar os resíduos que seriam importantes para a interação dos anticorpos gerados, foi produzida uma membrana de SPOT contendo uma série de análogos do peptídeo identificado, onde cada aminoácido foi substituído por uma alanina (ou uma glicina, no caso de alaninas pertencentes à sequência), para verificar os efeitos dessa substituição (figura 26). A substituição dos resíduos Y,P, A, D, pertencentes à porção N-terminal do peptídeo alterou significativamente a ligação dos anticorpos anti-peptídeo.

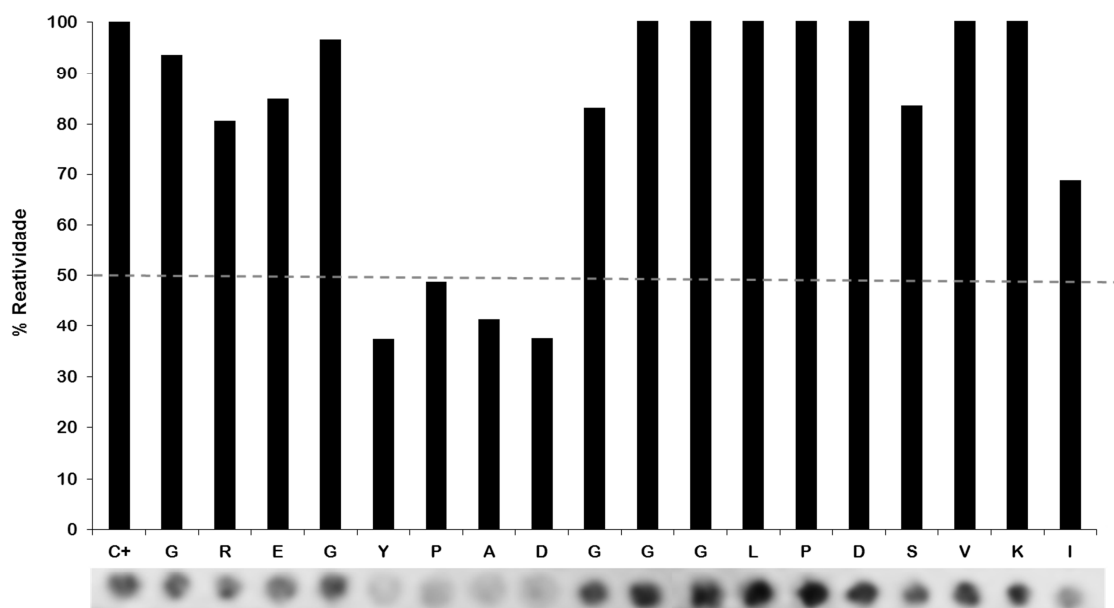


Figura 26: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do diepitopo, testada com o soro dos camundongos imunizados. A reatividade foi medida pela quantidade de pixels por área, no programa ImageJ. A sequência original do diepitopo foi utilizada como controle positivo (C+) e a sua medida correspondeu á 100% de reatividade, a partir da qual a reatividade dos demais spots foi calculada.

Tendo em vista a eficácia do conjugado peptídeo-OVA em gerar anticorpos neutralizantes em modelo murino, este imunógeno foi utilizado para imunizar coelhos.

Foram necessários dois ciclos de quatro doses para que os animais atingissem um título satisfatório de anticorpos. O soro produzido foi testado por ELISA quanto ao reconhecimento do peptídeo e de seus controles contendo as sequências N-terminal ou C-terminal, acrescidas de outra porção de sequência irrelevante (ASASASAS). O soro produzido, conforme os resultados obtidos anteriormente, foi capaz de reconhecer o peptídeo ligado à placa e não demonstrou reação contra os peptídeos controle neste formato (figura 27).

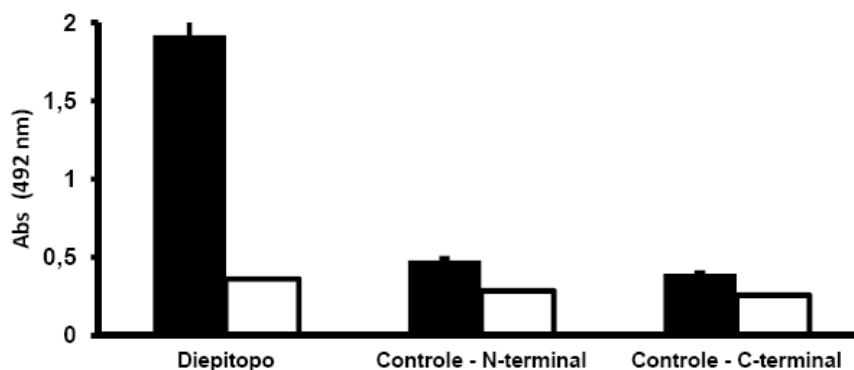


Figura 27: Reatividade, testada por ELISA, do soro de coelho anti-OVA-diepitopo. A placa foi sensibilizada com 100 μ l de solução contendo 10 μ g/ml do próprio diepitopo ou de peptídeos controle, contendo apenas o N-terminal ou C-terminal da sequência do diepitopo, acrescidos de uma sequência irrelevante de alaninas e serinas intercaladas (GREGYPADASASASAS ou ASASASASGLPDSVKI). O soro foi diluído 1:100.

O soro foi então utilizado em experimentos de neutralização *in vitro*. Um primeiro teste de neutralização foi realizado com grupos de 6 camundongos BALB/c, utilizando uma quantidade de veneno equivalente a 3 DL50 (45 μ g de veneno/20 g do animal). Foram feitos três grupos, que receberam respectivamente 200 μ l de salina (grupo S), 200 μ l de soro pré-imune (grupo P) e 200 μ l de soro imune (grupo I) (tabela 5). Para esta dose, o soro anti-OVA-diepitopo não foi capaz de neutralizar os efeitos letais e tóxicos do veneno, ainda que tenha sido capaz de retardar os sintomas do envenenamento e o óbito.

Um novo ensaio, utilizando menor quantidade de veneno foi realizado (1 DL50 equivalente a 15 μ g de veneno por cada 20 g do animal). Foram utilizados os mesmos parâmetros descritos para o ensaio precedente. Neste novo ensaio, não houve morte de nenhum animal de nenhum grupo. Porém, os sintomas de envenenamento apresentados pelos grupos P e S tiveram o seu início novamente retardado no grupo I (tabela 6).

Tabela 5: Ensaio de neutralização in vitro de 3 DL50 de veneno de T.serrulatus. Demonstração da sintomatologia apresentada ao longo do tempo, a partir da injeção do veneno ,pelos grupos testados. O grupo S recebeu o veneno pré-incubado apenas com solução salina, o grupo P recebeu o veneno pré-incubado com soro pré-imune, e o grupo I recebeu o veneno pré-incubado com o soro anti-OVA-diepitopo.

SINTOMAS	10 min			30 min			90 min			3 horas			24 horas		
	S	P	I	S	P	I	S	P	I	S	P	I	S	P	I
Agitação	X	X				X									
Fadiga	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X			
Sudorese	X	X		X	X		X	X	X		X	X			
Salivação	X	X		X	X	X	X	X	X		X	X			
Lacrimejamento	X	X		X	X	X	X	X	X		X	X			
Diarréia	X			X	X		X	X	X		X				
Dificuldade de respiração	X			X			X	X	X		X				
Sangramento				X			X	X			X				
MORTE				3			3	4	2	#	2	3	#	#	1

Tabela 6: Ensaio de neutralização in vitro de 1 DL50 de veneno de T.serrulatus. Demonstração da sintomatologia apresentada ao longo do tempo, a partir da injeção do veneno ,pelos grupos testados. O grupo S recebeu o veneno pré-incubado apenas com solução salina, o grupo P recebeu o veneno pré-incubado com soro pré-imune, e o grupo I recebeu o veneno pré-incubado com o soro anti-OVA-diepitopo.

SINTOMAS	10 min			30 min			90 min			3 horas			24 horas		
	S	P	I	S	P	I	S	P	I	S	P	I	S	P	I
Agitação							X	X		X	X	X			
Fadiga	X			X	X		X	X	X	X		X			
Sudorese				X			X	X	X						
Salivação				X	X	X	X	X	X						
Lacrimejamento	X			X	X		X	X	X	X	X	X			
Diarréia															
Dificuldade de respiração				X			X								
Sangramento															
MORTE	<i>Não houveram mortes em nenhum grupo</i>														

Com o intuito de verificar a especificidade dos anticorpos presentes no soro dos coelhos imunizados, foi realizado um ensaio de SPOT, utilizando a mesma membrana previamente testada para a identificação dos possíveis epitopos conformacionais (figura 28). O ensaio também foi conduzido como previamente descrito.

A análise das seqüências de aminoácidos presentes nos spots considerados reativos demonstra que apenas os spots que continham a seqüência GLPDSVKI ou parte desta (spots não marcados) foram reconhecidos pelo soro de coelho anti-OVA-diepitopo, apesar da seqüência N-terminal GREGYPAD também estar contida no imunógeno utilizado para a produção do soro (tabela 7).

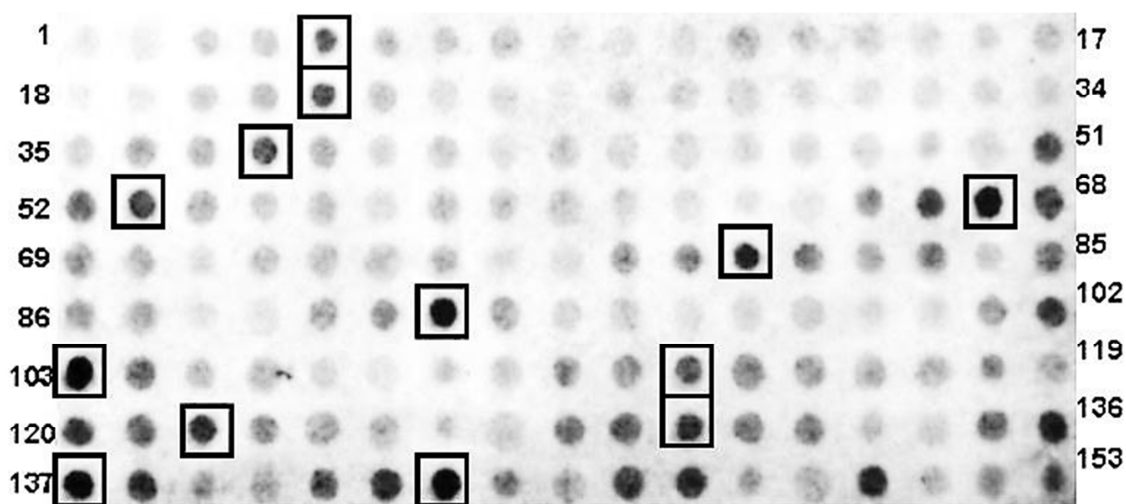


Figura 28 : Reatividade dos diepitopos preparados pela técnica de SPOT com soro de coelho anti-OVA-diepitopo. Membrana preparada pela técnica de SPOT, contendo os 153 diepitopos derivados da fórmula geral (P1)-(Gly-Gly)-(P2), após reação com soro de coelho anti-OVA-Diepitopo (1:500), e revelado a partir de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado á fosfatase alcalina com substrato MTT-BCIP. Os SPOTS de maior reatividade estão destacados.

O ensaio de ALA-Scan feito com o soro de coelho demonstrou perfil contrário ao obtido com camundongos, com as alterações de aminoácidos mais importantes para a ligação ocorrendo na porção C-terminal da molécula, sendo o resíduo de L de especial importância (figura 29).

Tabela 7: Lista das seqüências dos spots que apresentaram maior reatividade frente ao soro de coelho anti-OVA-diepitopo.

# SPOT	Seqüência	Intensidade
5	GREGYPADGGGLPDSVKI	128
22	GYPADSKGGGLPDSVKI	135
38	ADSKGCKIGGGLPDSVKI	138
53	KGCKITCFGGGLPDSVKI	153
67	KITCFLTAGGGLPDSVKI	181
79	CFLTAAGYGGGLPDSVKI	159
92	TAAGYCNTGGGLPDSVKI	192
103	GYCNTECTGGGLPDSVKI	205
113	NTECTLKKGGGLPDSVKI	127
122	CTLKKGSSGGGLPDSVKI	157
130	KKGSSGYCGGGLPDSVKI	146
137	SSGYCAWPGGGLPDSVKI	199
143	YCAWPACYGGGLPDSVKI	202

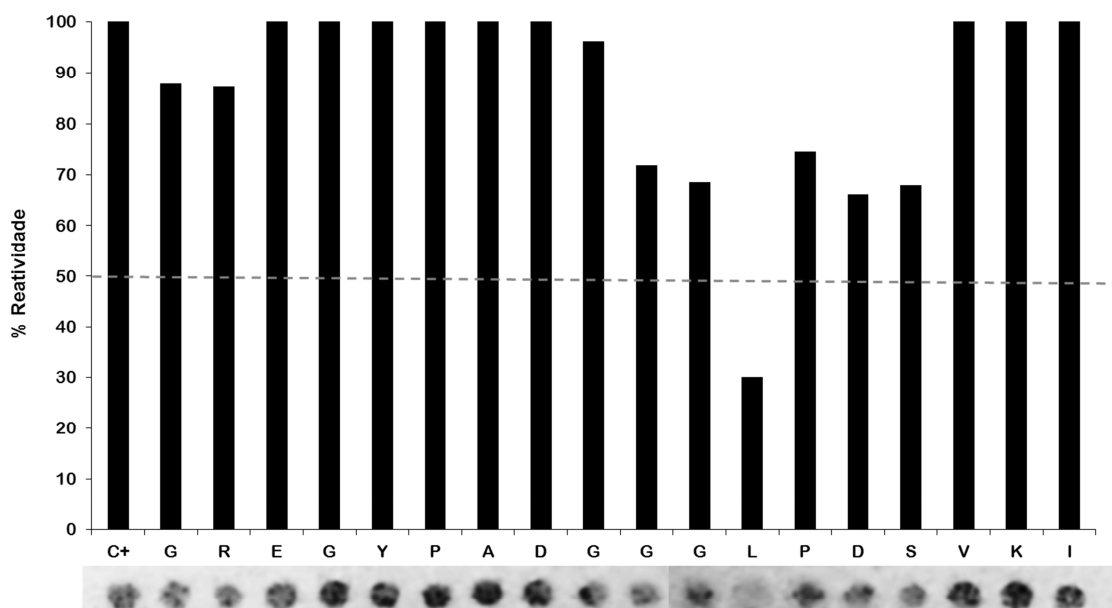


Figura 29: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do diepitopo, testada com o soro dos coelhos imunizados. A reatividade foi medida pela quantidade de pixels por área, no programa ImageJ. A seqüência original do diepitopo foi utilizada como controle positivo (C+) e a sua medida correspondeu á 100% de reatividade, a partir da qual a reatividade dos demais spots foi calculada.

4.2. Amm8

Sequências de aminoácidos sobrepostos, com 12 resíduos, derivados da sequência de Amm8 e AaH2 foram preparadas pelo método de SPOT, numa tentativa de analisar o perfil de epítopos lineares presentes no soro neutralizante anti-Amm8 previamente preparado (MARTIN-EAUCCLAIRE ET AL., 2006).

Esses anticorpos falharam em se ligar nos peptídeos contínuos derivados de sua sequência preparados por SPOT (figura 30-A). Entretanto, anticorpos anti-AaH2 claramente se ligaram a uma série de peptídeos antigênicos, tanto derivados da sua própria sequência quanto derivados da sequência da Amm8 (figura 30-B e C). O experimento foi repetido exaustivamente, utilizando diversas condições experimentais, incluindo a pré-incubação da membrana com maiores concentrações de anticorpos, e a mesma falta de reatividade do soro anti-Amm8 com seus peptídeos cognatos foi observada. Este foi um resultado inesperado, uma vez que esta abordagem já foi utilizada por diversas vezes e invariavelmente levou a identificação de possíveis epítopos contínuos em toxinas escorpiônicas (ALVARENGA ET AL., 2002), (MENDES, 2004), (MARIA ET AL., 2005). Portanto, aparentemente a Amm8 apenas apresenta epítopos do tipo descontínuo que escapam ao método convencional de mapeamento linear por SPOT.

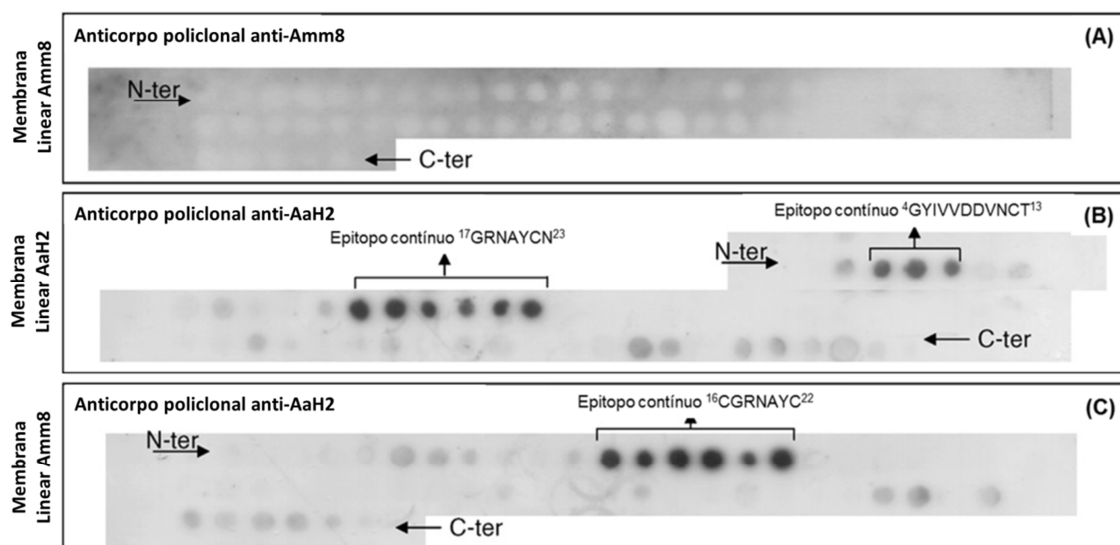


Figura 30: Reatividade de anticorpos policlonais contra peptídeos lineares sobrepostos das sequências da Amm8 e da AaH2, preparados pelo método de SPOT. (A) Reação dos anticorpos anti-Amm8 com membrana contendo 53 peptídeos de 12 aminoácidos, sobrepostos por um resíduo, derivados da sequência da Amm8. Os anticorpos foram diluídos a 100µg/ml. Revelação a partir de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído 1:2000, com substrato ECL. (B) Reação dos anticorpos anti-AaH2 com membrana contendo 53 peptídeos de 12 aminoácidos, sobrepostos por um resíduo, derivados da sequência da AaH2. (C) Reação de anticorpos anti-AaH2 com a membrana contendo peptídeos derivados da sequência da Amm8.

Com o objetivo de encontrar possíveis localizações para epítopos descontínuos na Amm8, a sua estrutura 3D foi modelada a partir da estrutura tridimensional resolvida da AaH2, com a qual apresenta grande similaridade de sequência primária (HOUSSET ET AL., 1994). Em seguida, o algoritmo PEPOP foi utilizado para prever peptídeos cuja sequência aproximaria segmentos espacialmente distantes na proteína, mimetizando assim possíveis epítopos descontínuos. Utilizando as coordenadas da estrutura ou modelo tridimensional de uma proteína, PEPOP identifica segmentos de resíduos expostos ao solvente (áreas contínuas) e agrupa-os com base em uma matriz de distâncias. Desse modo, 16 segmentos foram identificados (tabela 8), contendo de 1 a 6 resíduos.

Tabela 8: Segmentos acessíveis da Amm8, preditos e agrupados por PEPOP e sua posição na sequência linear da proteína.

Agrupamento	# Segmento	Tamanho	Sequência	Posição
1	1	3	LKD	1-3
	13	2	YK	49-50
	14	2	DH	53-54
2	2	1	Y	5
	3	4	NDIN	8-11
	4	2	YF	14-15
	10	3	QWA	37-39
	11	3	PYG	41-43
	15	3	RTK	56-58
	16	6	PGRCOND	60-65
3	5	4	RNAY	18-21
	6	2	NE	23-24
	7	4	IKLK	27-30
	8	2	ES	32-33
	9	1	Y	35-35
	12	1	Y	47-47

Esses segmentos foram automaticamente agrupados por PEPOP em 3 grupos (figura 31). A figura 31-A e B mostram, em duas diferentes orientações da estrutura modelada da Amm8, os três grupos de segmentos expostos. A figura 31-C demonstra como esses segmentos (utilizando código de cor específico para cada região) se organizam na estrutura primária e secundária da proteína.

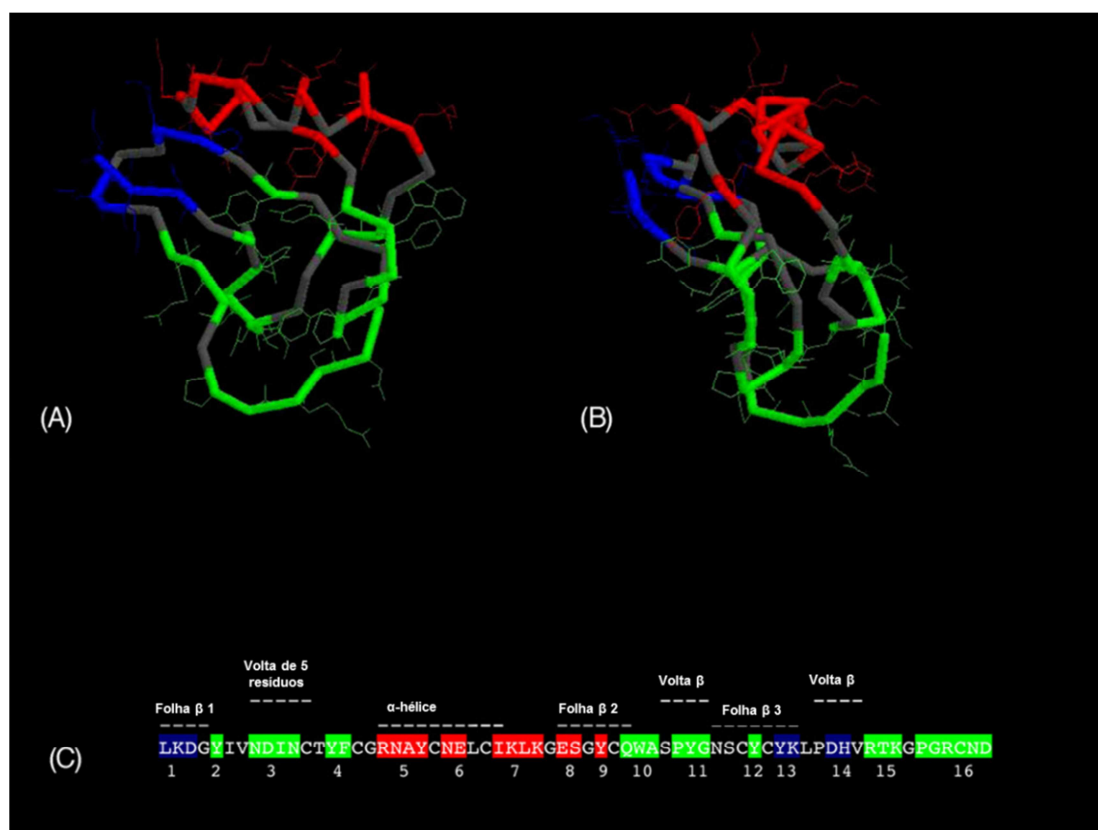


Figura 31: Segmentos e grupos identificados na estrutura do modelo da Amm8 pelo algoritmo PEPOP. (A) Modelo da estrutura da Amm8, feito a partir das coordenadas da estrutura resolvida de AaH2 (PDB: 1AHO), mostrando os três grupos de segmentos expostos na superfície da proteína, mostrados em diferentes cores. (B) Outra face do modelo da Amm8, mostrando os mesmos grupos de outro ângulo. (C) Segmentos expostos mostrados em relação à estrutura primária da Amm8. Estruturas secundárias estão assinaladas em branco.

A natureza descontínua dos grupos fica evidente pela sua localização na estrutura tridimensional da proteína. A partir dos 16 segmentos preditos, PEPOP foi novamente utilizado para automaticamente gerar peptídeos que reconstituíssem potenciais epítopos descontínuos. As sequências geradas foram então sintetizadas pela técnica de SPOT (tabela 9).

Tabela 9: Lista dos possíveis epítopos descontínuos da Amm8 preditos por PEPOP e sintetizados na membrana de SPOT. Aqueles que demonstraram reatividade com anticorpos policlonais anti-Amm8 estão destacados.

# SPOT	Sequência	Composição (segmentos)
1	QWAPYGYFRNAYNEIKLK	10+11+4+5+6+7
2	RNAYNEIKLKESYKLD	5+6+7+8+13+1
3	YFQWAPYGYYYNEIKLK	4+10+11+2+12+9+6+7
4	PYGQWAYYYFNDINRTK	11+10+12+2+4+3+15
5	NDINRTKYYQWAPYGYF	3+15+2+12+10+11+4
6	NDINRTKYYNEIKLK	3+15+2+12+9+6+7
7	IKLKESNEYYYYFQWA	7+8+6+9+12+2+4+10
8	PYGQWAYYYFRNAYNE	11+10+12+2+4+5+6
9	DHRTKYYNEIKLKES	14+15+1+12+9+6+7+8
10	RTKYYNEIKLKESYK	15+2+12+9+6+7+8+13
11	YKLDYYYNEIKLKES	13+1+2+12+9+6+7+8
12	YYQWAPYGYFRNAYNE	2+12+10+11+4+5+6
13	YYNEIKLKESYKLD	2+12+9+6+7+8+13+1
14	ESNEIKLKYYKLDYY	8+6+7+13+1+2+12
15	DHLKDYKESNEIKLK	14+1+13+8+6+7
16	LKDYKESNEIKLKD	1+13+8+6+7+14
17	NEIKLKESYKLDYY	6+7+8+13+1+2+12
18	PGRCDYFQWAPYGY	16+4+10+11+2
19	YNEIKLKESYKLDY	9+6+7+8+13+1+2
20	RNAYNEIKLKESY	5+6+7+8+9
21	IKLKESNEYRNAY	7+8+6+9+5
22	LKDYKDH	1+13+14
23	DHLKDYK	14+1+13
24	YKLDKDH	13+1+14

Anticorpos policlonais anti-Amm8 foram utilizados para testar, em um mesmo experimento, a membrana contendo os peptídeos lineares derivados da sequência da Amm8 e a membrana contendo os 24 peptídeos derivados da predição bioinformática feita por PEPOP.

Os anticorpos anti-Amm8 foram reativos com sete dos peptídeos “descontínuos-contínuos” preditos e, nessas mesmas condições, não foram capazes de

se ligar em peptídeos contínuos (figura 32). O mesmo padrão de reconhecimento foi observado quando se utilizou imunoglobulinas purificadas do soro anti-Amm8. Experimentos controle mostraram que a reatividade observada para a membrana contendo os possíveis epítopos conformacionais não foi devida ao reconhecimento pelo anticorpo secundário utilizado na revelação do ensaio ou a interação inespecífica, uma vez que soro pré-imune não demonstrou reação com nenhum dos peptídeos.

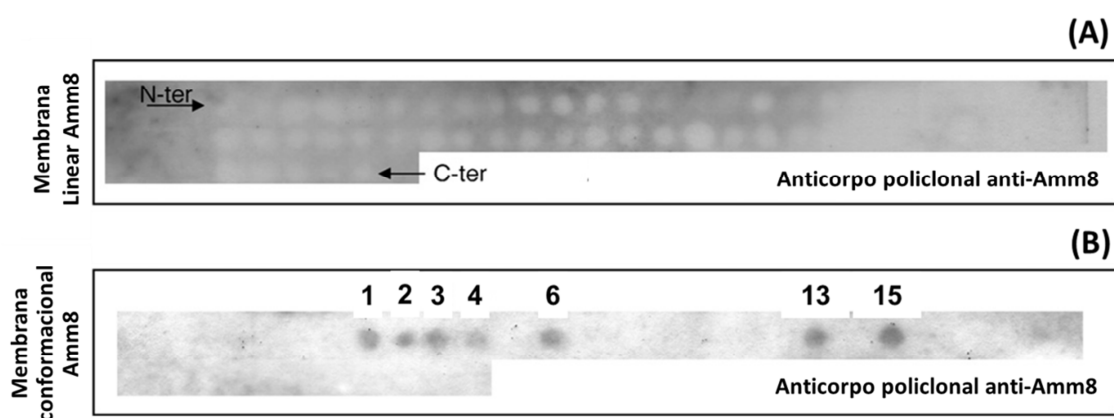


Figura 32: Reatividade de anticorpos policlonais anti-Amm8 com peptídeos lineares sobrepostos das sequências da Amm8 e com peptídeos conformacionais preditos por PEPOP. (A) Membrana contendo peptídeos lineares, demonstrando a ausência de reação. (B) Reatividade dos mesmos anticorpos, nas mesmas condições, com os peptídeos desenhados a partir da predição de PEPOP.

Na tabela 9, os peptídeos que se mostraram reativos estão destacados. Não foi possível identificar uma combinação única de segmentos especialmente associada com a reatividade, uma vez que segmentos encontrados em peptídeos reativos também foram identificados em peptídeos não-reativos.

Após esta identificação, a localização dos segmentos reativos foi feita no modelo da estrutura 3D da Amm8. A figura 33 mostra que três possíveis regiões antigênicas podem ser definidas pela análise da posição dos peptídeos reativos. A região “A” corresponde aos spots de número 2, 13 e 15. Os segmentos que compõem a região “A” compreendem a região da α -hélice (segmentos 5-7), da folha- β 1 (segmento 1), da folha- β 2 (segmento 8 e 9), da folha- β 3 (segmentos 12 e 13 e a volta β

(segmento 14). A região “B” foi definida pelos peptídeos descontínuos contínuos 1, 3 e 4. Todos estes peptídeos incluem os segmentos 10 e 11, correspondendo a uma grande região de loop das α -toxinas. Outros segmentos também estão presentes na região “B”, tanto da α -hélice (segmentos 5-7 nos peptídeos 1 e 3), ou de regiões menos estruturadas da proteína (segmentos 2 e 15 no peptídeo 4). A região “C” foi definida por um único peptídeo antigenicamente reativo, correspondente ao spot 6, que contém segmentos da α -hélice (segmento 6 e 7) e da volta de 5-resíduos (segmento 3), a 2ª e 3ª fita- β (segmentos 9 e 12) e do C-terminal (segmento 15). É importante ressaltar que um mesmo segmento pode estar presente em mais de uma região, mas isso é compatível com a visão de que uma mesma proteína pode apresentar regiões epitópicas que se sobrepõem.

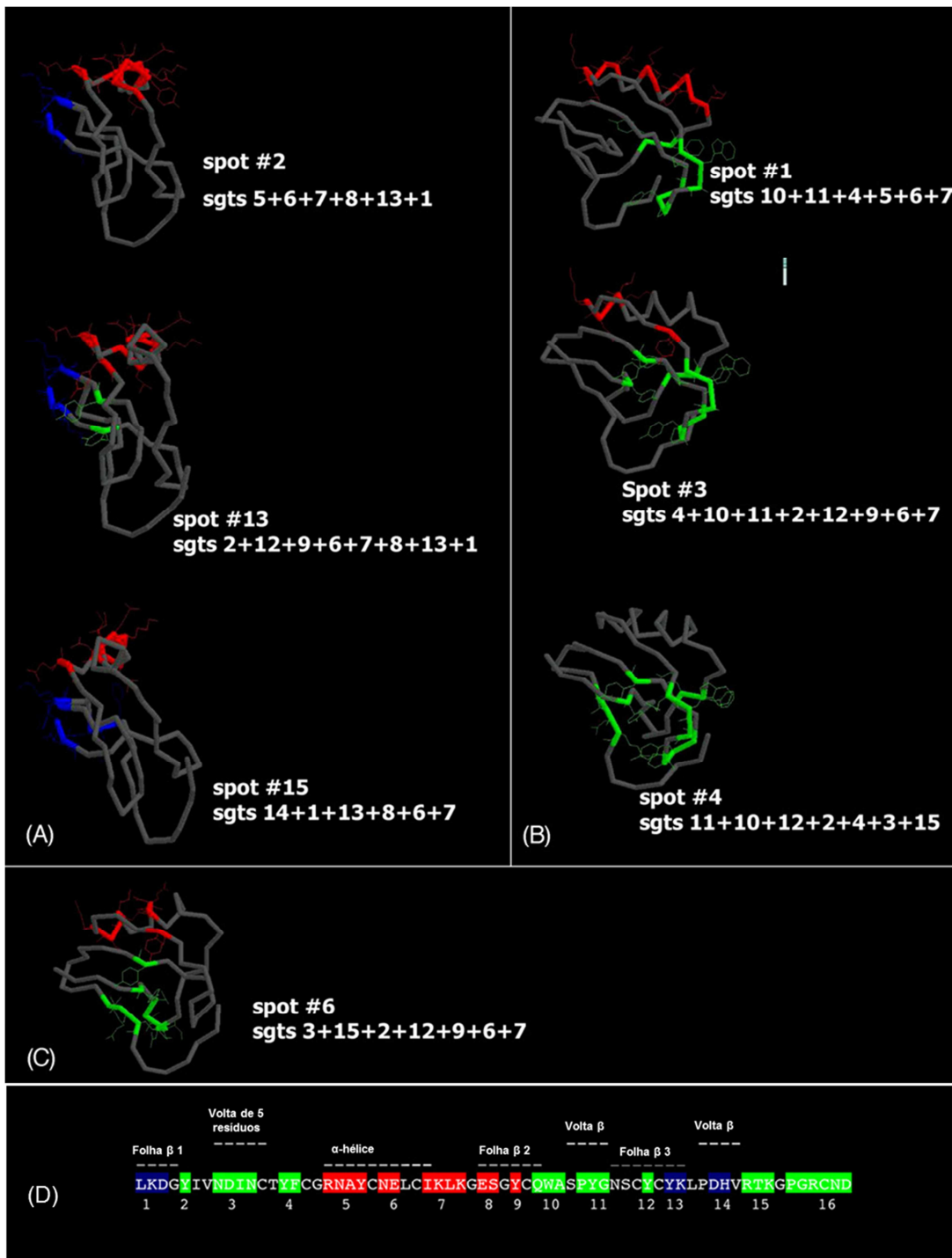


Figura 33: Regiões descontínuas antigênicas da Amm8, deduzidas a partir da localização dos segmentos reativos com os anticorpos policlonais de coelho anti-Amm8. (A) Peptídeos correspondentes aos SPOTs 2, 13 e 15 definem a região denominada A. (B) Peptídeos correspondentes aos SPOTs 1, 3 e 4 definem a região B. (C) O peptídeo 6 define a região C. (D) Segmentos expostos mostrados em relação à estrutura primária da Amm8. Amm8 Estruturas secundárias estão assinaladas em branco.

Uma vez que foi previamente demonstrado que o soro anti-Amm8 reage cruzadamente com a AaH2 e é capaz de neutralizar a toxicidade desta potente toxina *in vitro* e *in vivo*, desenhamos uma série de peptídeos descontínuos-contínuos a partir da estrutura 3D da AaH2, utilizando novamente o PEPOP. Encontramos que o soro anti-Amm8 reagiu cruzadamente com sete dos peptídeos desenhados (figura 34), mas não são capazes de reconhecer nenhum dos peptídeos contínuos sobrepostos derivados da sequência de aminoácidos da AaH2.

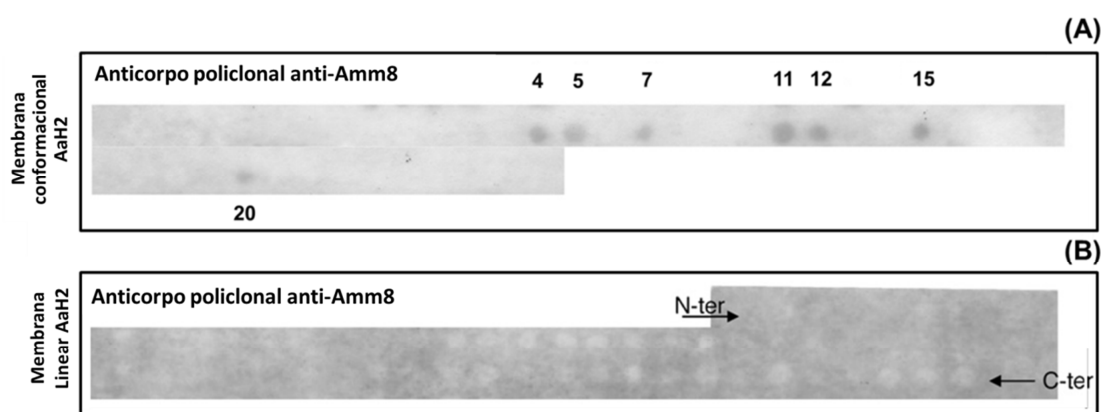


Figura 34: Reatividade de anticorpos policlonais anti-Amm8 com peptídeos lineares sobrepostos das sequências da AaH2 e com peptídeos conformacionais preditos por PEPOP.

(A) Membrana contendo peptídeos conformacionais preditos por PEPOP para a AaH2, demonstrando a reação cruzada com os anticorpos anti-Amm8. (B) Membrana contendo peptídeos lineares sobrepostos derivados da sequência primária da AaH2, demonstrando a falta de reatividade cruzada.

A tabela 10 mostra a sequência e a composição dos spots reativos de sequência derivada da AaH2 com que reagiram com os anticorpos anti-Amm8. Com exceção dos peptídeos 12 e 15, que são homólogos aos peptídeos 13 e 15 preditos a partir da estrutura modelada da Amm8, todos os outros peptídeos foram diferentes.

Tabela 10: Lista dos epítomos descontínuos preditos a partir da AaH2, reativos com os anticorpos policlonais anti-Amm8 por SPOT.

# SPOT	Sequência	Composição (segmentos)
4	PYGQWAGRNAYNETKLLK	11+10+5+6+7
5	QWAPYGRNAYNETKLLK	10+11+5+6+7
7	DDVTYFGRNAYNETKLLK	3+4+5+6+7
11	YYTYFGRNAYNETKLLK	12+2+4+5+6+7
12	YYNETKLLKESYKVKD	2+12+9+6+7+8+13+1
15	DHVKDYKESNETKLLK	14+1+13+8+6+7
20	DDVTYFRTKGPGRCH	3+4+15

A figura 35 mostra os segmentos que correspondem aos peptídeos reativos, arranjados no contexto da estrutura 3D da AaH2. Peptídeos 4, 5, 11, 12 e 15 correspondem às regiões antigênicas “A” e “B” que foram anteriormente definidas na estrutura tridimensional da proteína Amm8: os anticorpos demonstraram maior ligação com os segmentos advindos da α -hélice, fitas- β 1 e 2. De maneira diferente, entretanto, dois peptídeos da AaH2 (7 e 20), compartilharam segmentos pertencentes ao domínio C-terminal da AaH2.

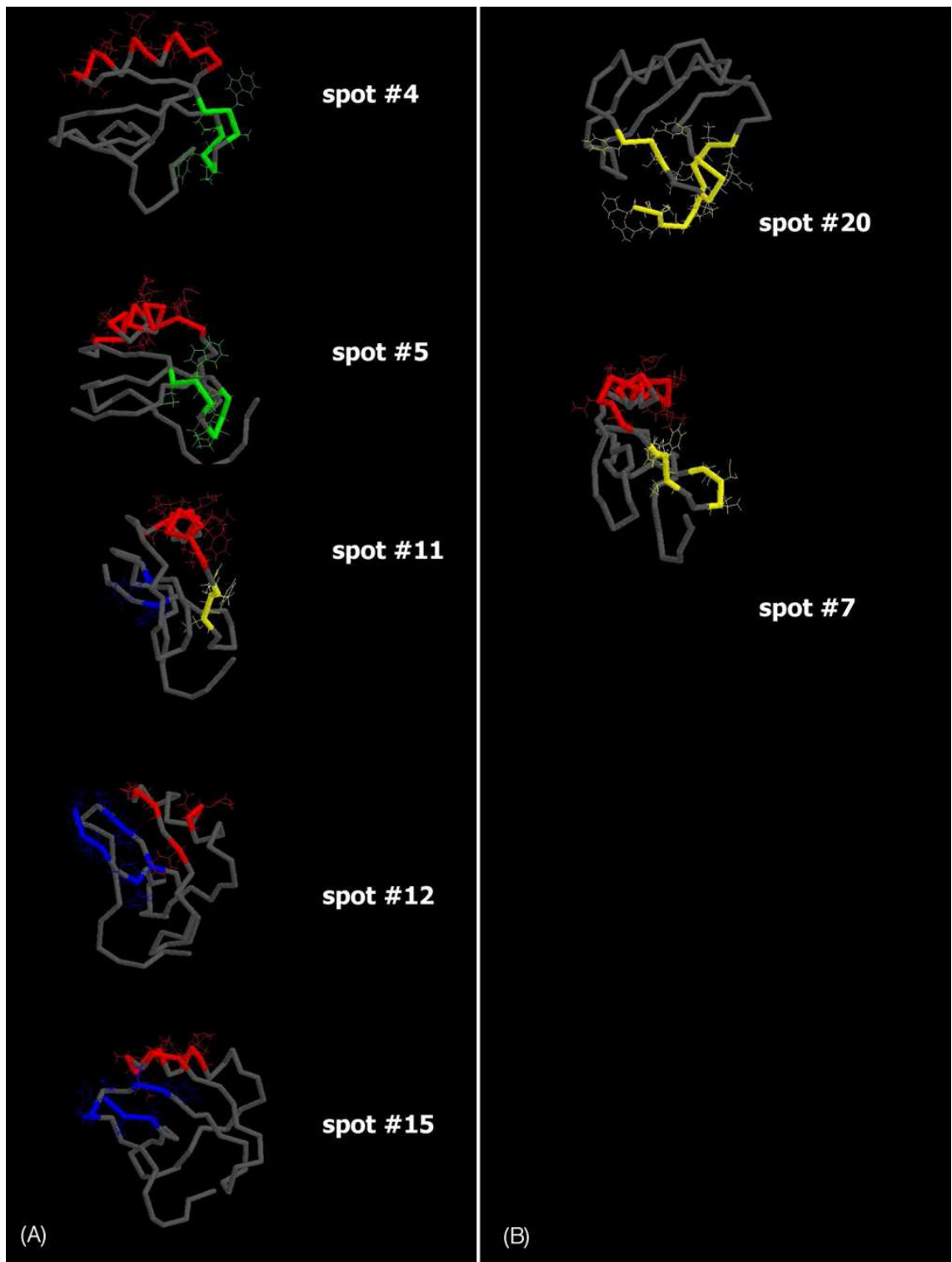


Figura 35: Localização dos peptídeos reativos por SPOT, localizados na estrutura 3D da AaH2 (PBD: 1AHO). (A) Peptídeos 4, 5, 7, 12 e 15 se encontram em regiões previamente mapeadas na Amm8.Amm8 (B) Peptídeos 11 e 20 demonstram o envolvimento da porção C-terminal da AaH2.AaH2

Na tentativa de evidenciar se os anticorpos que apresentaram reação cruzada poderiam estar envolvidos nas propriedades neutralizantes dos anticorpos anti-Amm8, três dos peptídeos descontínuos-contínuos antigênicos (peptídeos 12 e 15 da região “A” e peptídeo 4 da região “B” foram sintetizados em sua forma solúvel, acoplados a uma proteína carreadora, no caso o KLH (“key limphet heamocyanin”) e utilizados para imunizar camundongos C57BL/6. Após o ciclo de imunizações, uma pequena resposta contra a AaH2 foi observada no grupo de animais que recebeu o peptídeo 12. Animais dos outros grupos não manifestaram resposta estatisticamente relevante contra a toxina, mesmo que uma resposta anti-peptídeo tenha sido observada no grupo imunizado com o peptídeo 15.

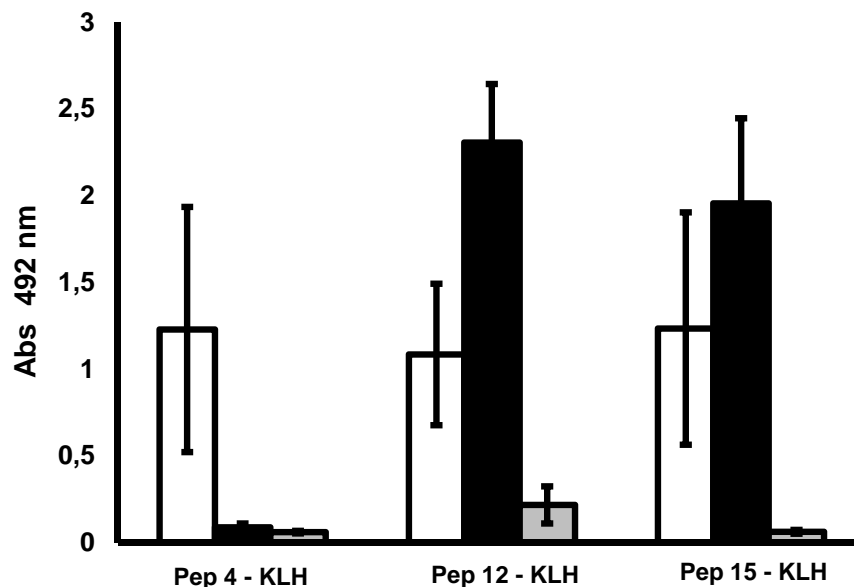


Figura 36: Reatividade, medida por ELISA, do soro de camundongos C57BL/6 imunizados com os peptídeos da AaH2 reativos por SPOT com anticorpos policlonais anti-Amm8. As barras brancas representam a reatividade frente ao KLH. As barras pretas representam a reatividade frente ao peptídeo relacionado. As barras cinzas representam a reatividade frente a toxina AaH2. A placa foi sensibilizada com 100 µl de solução contendo 10 µg/ml de cada um dos antígenos citados acima. Os resultados são expressos como a média duplicata da absorbância dada pela diluição de 1:100 do soro dos camundongos. O asterisco indica que a reatividade dos anticorpos anti-Pep12 foi significativamente maior do que aquela com anti-Pep4 ($p=0.0274$) e com anti-Pep15 ($p=0.0290$).

Animais dos três grupos foram desafiados com uma dose letal da toxina AaH2 purificada correspondente a 3,4 DL50. Não foi possível detectar neutralização nos grupos que receberam como imunógenos os peptídeos 4 e 15, carregados ao KLH, como imunógeno, o que foi consistente com o ensaio de ELISA. Uma leve proteção parece ter ocorrido no grupo que recebeu o peptídeo 12 (1/4, ou 25%), também condizente com a sua resposta fraca anti-AaH2 obtida em ELISA.

Tabela 11: Desafio in vivo de camundongos C56BL/6 imunizados com peptídeos conjugados com a toxina AaH2.

Grupo	Imunógeno	Sobrevivência
1	Pep4-KLH	0/4
2	Pep12-KLH	1/4
3	Pep15-KLH	0/4

4.3. AaH2

Visando um uso mais refinado do programa PEPOP e uma consequente validação do método, os idealizadores do programa propuseram a utilização de anticorpos monoclonais para o estudo de epitopos descontínuos preditos por bioinformática. O monoclonal 4C1, desenvolvido por Bahraoui e colaboradores em 1988, foi escolhido. Além de ser dirigido contra o arquétipo das α -toxinas, a AaH2, é um anticorpo que já foi caracterizado anteriormente, estando disponíveis dados para a comparação dos resultados obtidos. Além disso, seu alto poder neutralizante da atividade tóxica do veneno de *A. australis*, desperta o interesse para que os mecanismos envolvidos nesta neutralização sejam elucidados.

O programa PEPOP passou por algumas reformulações e passou a contar com outras ferramentas para a montagem de peptídeos a partir dos segmentos preditos, justificando-se a realização de nova predição para a toxina AaH2. Enquanto a predição feita para o estudo dos possíveis epitopos dos anticorpos policlonais anti-Amm8 contava apenas com os métodos “Nearest Neighbours” (e sua versão Otimizada) e

“Nearest Flanking” (e sua versão Otimizada), esta nova predição contou com novos métodos, que foram criados visando um design de peptídeos que se aproxime ao máximo da conformação tridimensional real da proteína. Assim, nesta nova versão do programa, é possível a inversão da sequência dos segmentos e a adição de espaçadores entre os segmentos. Para a criação da matriz de distância foram considerados os segmentos presentes em um raio de 10 Å, além dos outros métodos já descritos.

Nesta nova predição, foram selecionados 16 segmentos e, a partir deles, PEPOP propôs 116 sequências diferentes. Estas sequências foram também sintetizadas pelo método de SPOT e foram então testadas com o mAb 4C1, gentilmente cedido pelo grupo da Dra. Marie-France Martin Eauclaire.

Tabela 12: Segmentos acessíveis da AaH2, preditos e agrupados por PEPOP e sua posição na sequência linear da proteína.

Agrupamento	# Segmento	Tamanho	Sequência	Posição
1	16	5	PGRCH	60 - 64
2	3	3	DDV	8 - 10
	12	1	Y	47 - 47
3	15	3	RTK	56 - 58
	2	1	Y	5 - 5
	10	3	QWA	37 - 39
4	11	4	PYGN	41 - 44
	4	3	TYF	13 - 15
	1	3	VKD	1 - 3
5	13	2	YK	49 - 50
	14	2	DH	53 - 54
	5	5	GRNAY	17 - 21
6	6	2	NE	23 - 24
	7	4	TKLK	27 - 30
	8	2	ES	32 - 33
	9	1	Y	35 - 35

A membrana contendo os peptídeos preditos pela nova versão do PEPOP, ao ser testada com 10 µg/ml do anticorpo monoclonal mAb 4C1, apresentou apenas um spot reativo (figura 37). Este resultado foi confirmado e repetido utilizando-se duas metodologias de detecção, por fosfatase alcalina (figura 37-A) e por ECL (figura 37-B).

A sequência deste SPOT foi identificada como PYGNAAWQAAY. Este peptídeo corresponde a três segmentos aparentemente expostos da toxina: o segmento 11 (PYGN), o segmento 10 invertido (de QWA a AWQ) e o segmento 9 (Y), sendo que espaçadores de alanina foram adicionados automaticamente entre os segmentos da sequência predita pelo programa PEPOP, visando melhor adequar a disposição dos segmentos à maneira como estariam relacionados na estrutura 3D da proteína. Outros peptídeos preditos a partir da AaH2 contendo o segmento PYGN combinado a outros resíduos aromáticos ou carregados (sabidamente susceptíveis a interações não específicas) não foram reativos.

Tabela 13: Sequência de aminoácidos dos 116 peptídeos preditos por PEPOP a partir da estrutura 3D da AaH2.

# SPOT	Sequência	# SPOT	Sequência
1	VKDYKESNETKLKDH	59	ESANEATKLKAAKY
2	VKDAYKAAESANETKLKDH	60	YYYKESNETKLK
3	DHVKDYKESNETKLK	61	YAA YAA YKAAESNETKLK
4	DHAAVKDAYKAAESNETKLK	62	YNETKLKESYKVKDY
5	TKLKDHSVVDYKESNE	63	YAA NEATKLKAAESYKVKDY
6	TKLKAADHAAVKDYKESNE	64	RTKYYNETKLKESYK
7	VKDAYKAAESANE	65	RTKAAAYAYAA YNETKLKESYK
8	ESYKDHVKDY	66	YAA NEATKLKAAES
9	VKDAYKAAADH	67	GRNAYNEESYYYQWA
10	YYNETKLKESYKVKD	68	GRNAYAA NEAAAESYYYQWA
11	YAYAYAA NEATKLKESYKVKD	69	QWAPYGN GRNAYNETKLK
12	YKDHRTKYYNETKLK	70	QWAAAPYGN AGRNAYNETKLK
13	YKAAADHARTKYYNETKLK	71	YYQWAPYGN GRNAYNE
14	YAYAYAA NEATKLK	72	YAYAAQWAAAPYGN GRNAYNE
15	YYRTKTYF	73	QWANGYPTYFGRNAY
16	YAYAYAA RTKTYF	74	QWANGYPAAATYF
17	DDVTYFGRNAYNETKLK	75	YYQWAPYGN
18	DDVAAATYFAAGR NAYNETKLK	76	YAYAAQWAAAPYGN
19	DHRTKDDVTYFGRNAY	77	PYGNQWAGR NAYNETKLK
20	DHAARTKAAADDVTYFGRNAY	78	PYGNAAQWAAAAGR NAYNETKLK
21	DDVTYFNGYPAWQYNE	79	PGRSHPYGNQWAGR NAY
22	DDVAAATYFAANGYP	80	PGRSHAAA PYGNQWAGR NAY
23	DDVRTKPGRSHTYF	81	PYGNAWQYNETKLKES
24	RTKAAADDV	82	PYGNAAWQAAY
25	TYFGRNAYNETKLKES	83	QWAPYGN TYF
26	TYFAAGR NAYAA NETKLKES	84	QWAAAPYGN AATYF
27	YYTYFGR NAYNETKLK	85	YKESYYYTYFGRNAY
28	YAYAA TYFAAGR NAYNETKLK	86	YKAAESAA YAA YYTYFGRNAY
29	TYFNGYPAWQYNETKLK	87	YKTRHDVKDYKESNE
30	TYFAANGYPAAA WQ	88	YAYAAKTRAADH
31	PYGNYYTYF	89	YKESNEYYYTYFQWA
32	PYGNAAAYAYATYF	90	YKAAESANEAAA YYYTYFQWA
33	GRNAYNETKLKESYK	91	YKVKDY YNETKLKES
34	GRNAYAA NEATKLKESYK	92	YKAVKDAAYAYNETKLKES
35	PYGN GRNAYNETKLK	93	YKAVKDAAYAY
36	PYGNAAAGR NAYNETKLK	94	TKLKESYKVKDY
37	GRNAYENSEKYDKVDH	95	TKLKA AESAA YKVKDY
38	GRNAYAA ENASE	96	DHRTKYYNETKLKES
39	GRNAYNE	97	DHAARTKAAAY YNETKLKES
40	GRNAYAA YAANE	98	TKLKVVDYKDHRTKYY
41	NETKLKESYKVKDYY	99	TKLKA AVKDAYKDHRTKYY
42	NEATKLKAAESYKVKDYY	100	TKLKDHR TKYYKVKD
43	VKDESNETKLKYKDH	101	TKLKAADHAA RTKYYKVKD
44	VKDA AAESANETKLKYKDH	102	DHAARTKAAAY
45	NEATKLKAAES	103	VKDDHRTK
46	GRNAYNETKLKESYY	104	VKDAADHAA RTK
47	GRNAYAA NEATKLKESYY	105	VKDYKDHRTKYYNE
48	TKLKESNEYYYTYFGRNAY	106	VKDAYKAAADHAA RTKYYNE
49	TKLKA AESANEYYYTYFGRNAY	107	RTKAAAYAYAY
50	GRNAYNETKLKESYYYTYF	108	DHRTKYDDV
51	GRNAYAA NEATKLKESYYYTYF	109	DHAARTKAA YAAADDV
52	TKLKESNEYANRNGYYP	110	PGRSHTYFGRNAYNE
53	TKLKA AESANE	111	PGRSHAA TYFAAGR NAYNE
54	YKESNETKLK	112	RTKPGRSHTYFGRNAY
55	YKAAESANEATKLK	113	RTKAAAPGRSHAA TYFGRNAY
56	ESNETKLKYKVKDYY	114	PGRSHTYFNGYPAWQ
57	ESANEATKLKAAAYKVKDYY	115	PGRSHAA TYFAANGYP
58	ESNETKLKYDKVDH	116	DDVPGRSHPYGN

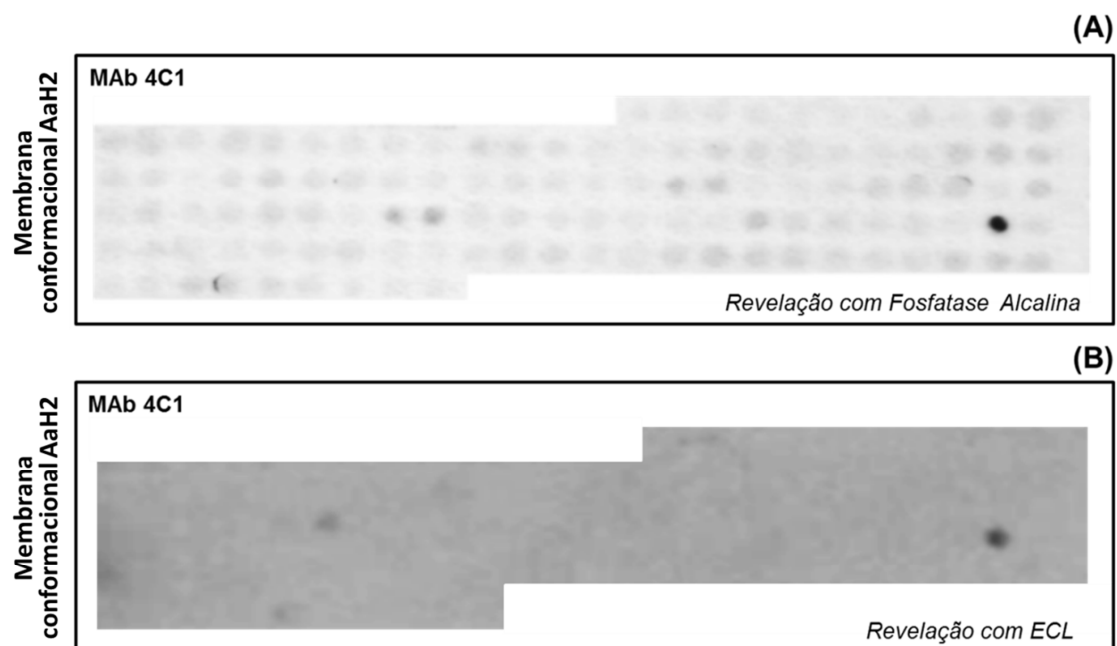


Figura 37: Reatividade do anticorpo monoclonal anti-AaH2 4C1 com a membrana contendo 116 peptídeos derivados da estrutura da AaH2, a partir de predição feita por PEPOP . O anticorpo foi utilizado a 10 µg/ml, quantidade capaz de neutralizar a atividade tóxica da AaH2.AaH2 (A) Revelação com anticorpo anti-mouse conjugado á fosfatase alcalina, diluído 1:2000. (B) Revelação pela metodologia de ECL, com anticorpo anti-mouse conjugado á peroxidase, diluído também 1:2000.

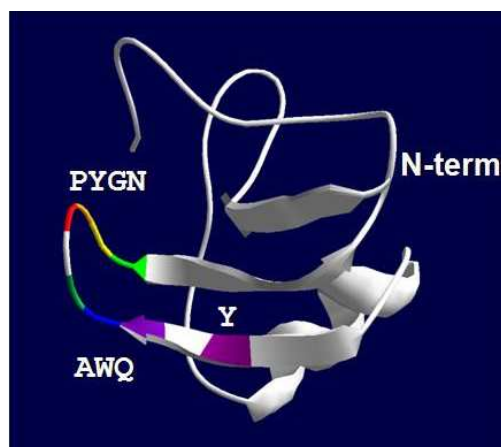


Figura 38: Localização espacial do peptídeo descontínuo identificado na superfície da estrutura tridimensional resolvida da AaH2. Cada aminoácido está destacado em cor diferente.

Para avaliar a especificidade da reação detectada entre o mAb 4C1 e o peptídeo mapeado, a membrana contendo os peptídeos preditos por PEPOP para a AaH2 foi testada com outros anticorpos: o anticorpo secundário utilizado nos sistemas de detecção, conjugado à peroxidase ou à fosfatase alcalina; o monoclonal mAb 9C2, dirigido contra a toxina AaH1, sendo esta também uma α -toxina presente no veneno de *A. australis*; e um anticorpo monoclonal não relacionado (anti-proBNP. Não foi possível observar reação com nenhum destes anticorpos citados com a membrana.

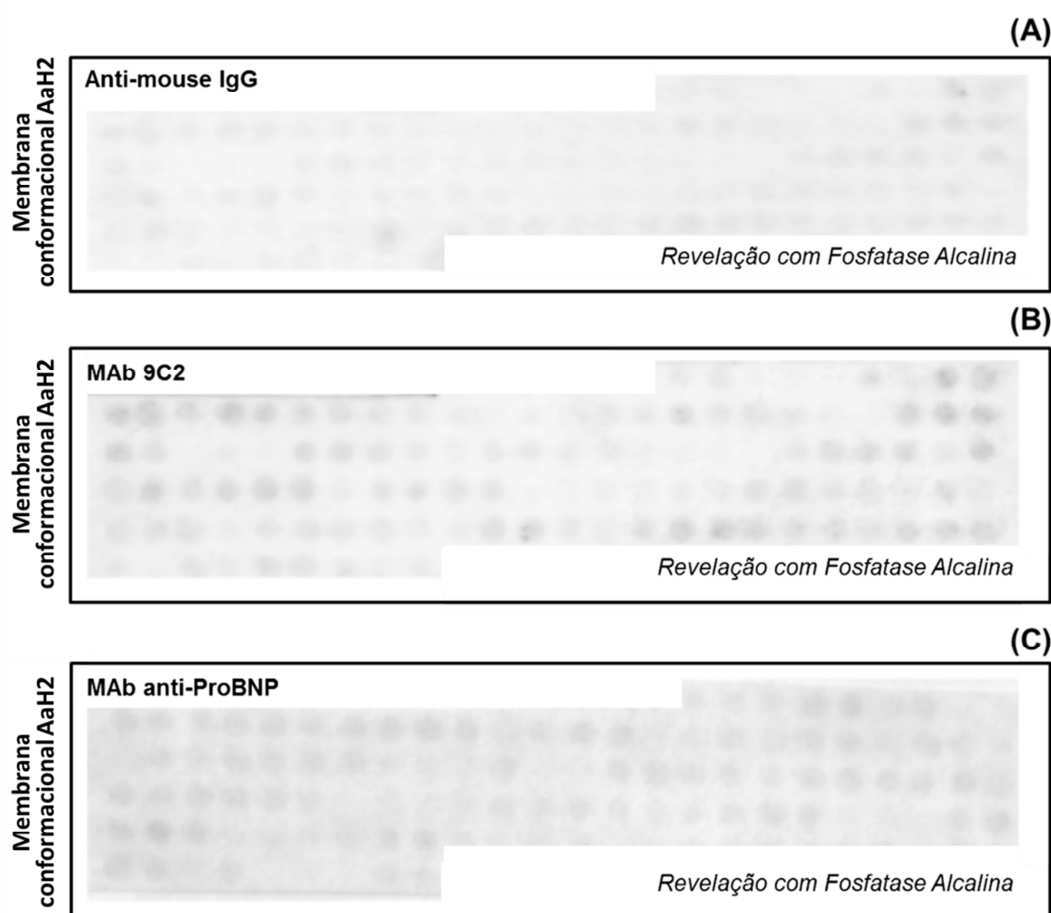


Figura 39: Controle da reatividade da membrana conformacional AaH2, testada com outros anticorpos, seguindo o mesmo protocolo. (A) Teste apenas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina, diluído 1:2000. (B) Teste com o anticorpo monoclonal anti-AaH1 9C2, a 10 μ g/ml. (C) Teste com anticorpo monoclonal não relacionado (anti-BNP), a 10 μ g/ml.

Como mais um controle, o mAb 4C1 também foi testado para verificar a sua reatividade em outras membranas, uma contendo peptídeos lineares derivados da

sequência da AaH2, e outra com peptídeos derivados de predição de epitopos descontínuos feita por PEPOP para a toxina AaH1. Nenhuma reação foi detectada com nenhuma das membranas, demonstrando mais uma vez o caráter específico da interação com região mapeada. Além disso, a falta de reatividade do mAb 4C1 com peptídeos lineares confirma mais uma vez que seu epítipo deve ser realmente descontínuo.

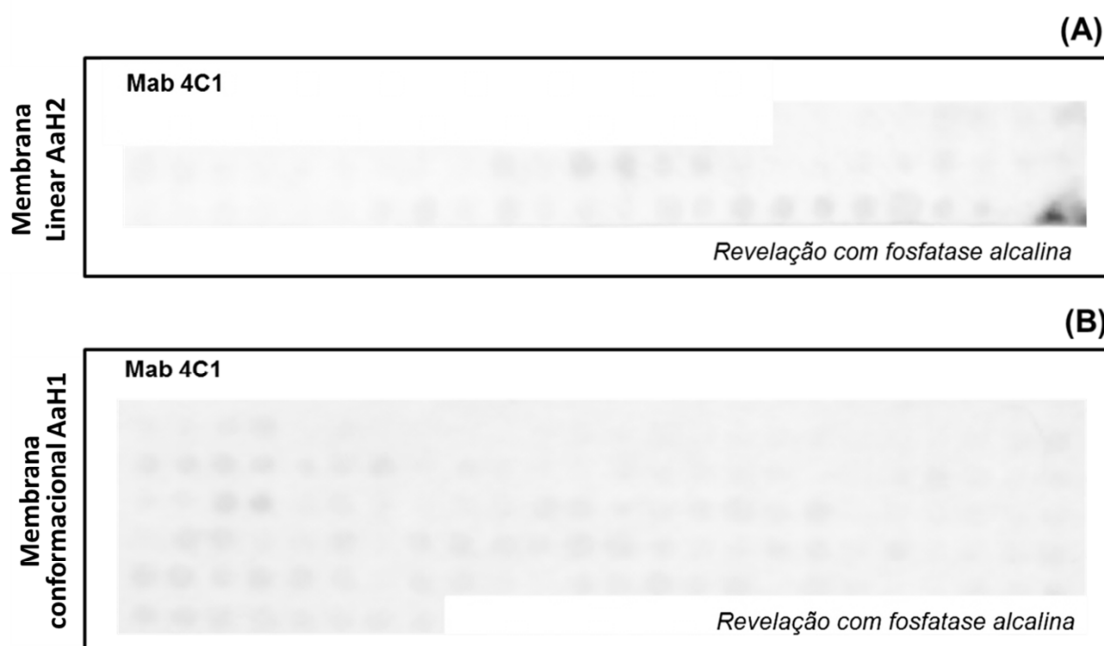


Figura 40: Controle da reatividade do anticorpo monoclonal 4C1, seguindo o mesmo protocolo. (A) Teste com a membrana contendo peptídeos lineares sobrepostos cobrindo toda a sequência primária da AaH2. (B) Teste com a membrana contendo peptídeos conformacionais, preditos por PEPOP, derivados da estrutura do modelo 3D da AaH1.

Visando identificar os resíduos que seriam importantes para a ligação entre o peptídeo mapeado e o monoclonal, um ALA-Scan foi realizado (figura 41). A membrana sintetizada foi testada com 10 µg/ml do mAb 4C1. Foi possível detectar que os peptídeos 7, 8 e 10, correspondentes a análogos que apresentam, respectivamente, os aminoácidos Q, W e A (espaçador artificialmente adicionado à sequência por PEPOP), alterados. Isto indica a importância destes resíduos para a interação com o mAb 4C1. Conforme esperado, o mAb 4C1 reagiu com o peptídeo controle, contendo a sequência PYGNAAWQAA, e com os peptídeos de 1-8. A substituição do segundo espaçador

também reduziu a interação do peptídeo com o anticorpo, sugerindo que a distribuição especial correta é importante para o reconhecimento.

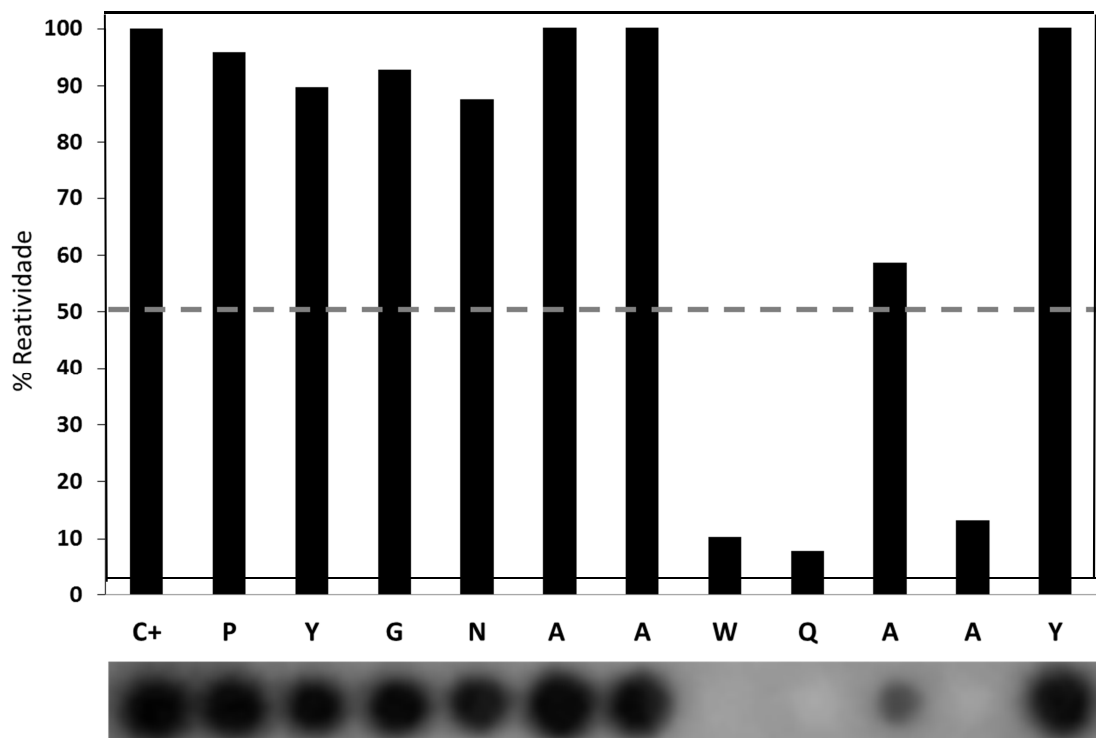


Figura 41: Gráfico de reatividade e membrana de ALA-Scan do peptídeo identificado, testada com mAb 4C1. A reatividade foi medida pela quantidade de pixels por área, no programa ImageJ. A sequência original do peptídeo foi utilizada como controle positivo (C+) e a sua medida correspondeu á 100% de reatividade, a partir da qual a reatividade dos demais spots foi calculada.

Uma série de peptídeos controles manualmente definidos, para mais uma vez assegurar a especificidade da reação, também foram sintetizados em membrana de SPOT. São eles: peptídeo contendo a mesma sequência do peptídeo reativo, porém sem a inversão do segmento QWA (PYGNAQWAAAY - spot1); peptídeo contendo a mesma sequência do peptídeo reativo, porém sem os espaçadores de alanina (PYGNAWQY – spot 2); peptídeo sem a inversão do segmento e sem os espaçadores de alanina (PYGNQWAY – spot3); peptídeo contendo o mesmo conteúdo de aminoácidos, porém em ordem aleatória (AAYYWPAGQNA – spot 4); e peptídeos selecionados na face oposta da toxina AaH2 (DHAARTKAAAYAYAAY – spot 5 / PGRSHAATYFAANGYP – spot 6 / VKDAYKAAESANE – spot 7 / YKAVDAAAYAYAAT- spot 8 / GRNAYAAENATKLK –

spot 9) (tabela 14). Nenhum destes controles apresentou reação com o monoclonal, mais uma vez confirmando a especificidade de ligação e a importância do arranjo correto entre os segmentos para que haja interação (figura 42).

Tabela 14: Lista dos peptídeos controles do peptídeo descontínuo identificado, sintetizados em membrana de SPOT.

#SPOT	Sequência	Modificação
1	PYGNAQWAAAY	Segmento QWA sem inversão
2	PYGNAWQY	Segmentos sem adição de espaçadores
3	PYGNQWAY	Segmentos sem adição de espaçadores e segmento QWA sem inversão
4	AAYYWPAGQNA	Mesmo conteúdo de aminoácidos em sequência aleatória
5	DHAARTKAAYAYAAY	Peptídeo predito não reativo
6	PGRSHAATYFAANGYP	Peptídeo predito não reativo
7	VKDAYKKAESANE	Peptídeo predito não reativo
8	YKAVJDAAYAYAAT	Peptídeo predito não reativo
9	GRNAYAAENATKLLK	Peptídeo predito não reativo

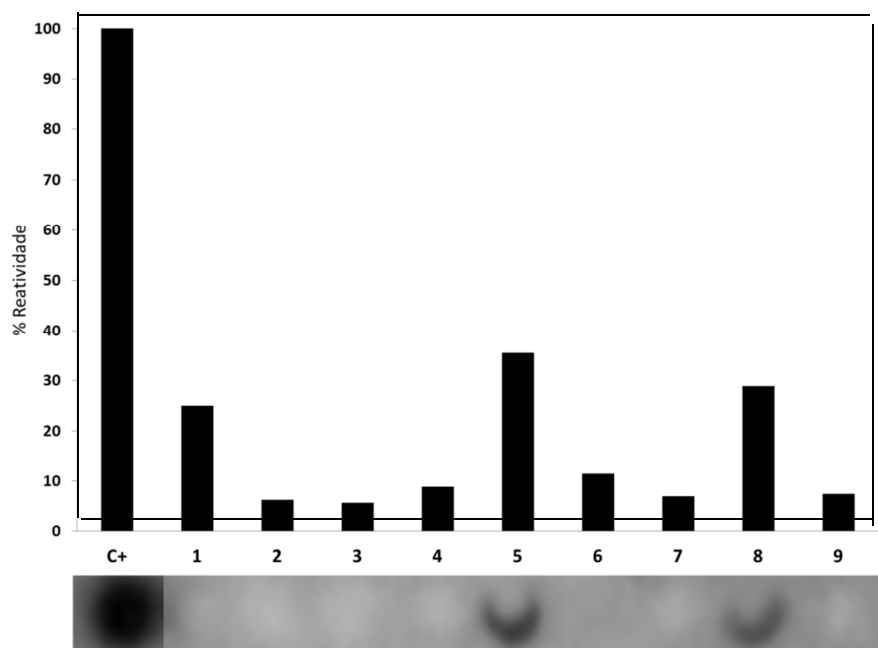


Figura 42: Gráfico de reatividade e membrana de controles do peptídeo descontínuo identificado, testada com o MAb 4C1. A reatividade foi medida pela quantidade de pixels por área, no programa ImageJ. A sequência original do peptídeo descontínuo foi utilizada como controle positivo (C+) e a sua medida correspondeu á 100% de reatividade, a partir da qual a reatividade dos demais spots foi calculada.

Uma vez atestada a especificidade de interação entre o mAb 4C1 e o peptídeo PYGNAAWQAAY, este foi sintetizado em fase solúvel para ser utilizado em experimentos de competição e imunização. Um peptídeo controle, de sequência correspondente ao peptídeo 9 da membrana de controles (GRNAYAAENATKLLK) também foi sintetizado para ser utilizado como controle negativo nos experimentos.

Primeiramente foi realizada uma ELISA de competição. Neste ensaio, o mAb 4C1 foi pré-incubado com diferentes concentrações do peptídeo identificado, do peptídeo controle e da toxina AaH2. A incubação se procedeu conforme descrito em Materiais & Métodos, e logo após a mistura mAb 4C1 mais peptídeo reativo, peptídeo controle ou AaH2 foi adicionada em placa de ELISA previamente sensibilizada com a AaH2 a 1 µg/well. Desta maneira, a fração de mAb 4C1 que não se ligou durante a incubação estaria disponível para se ligar na placa. Conforme esperado, a AaH2 foi capaz de competir com ela mesma, e o peptídeo controle não competiu com a toxina pelo sítio do monoclonal. Apesar de certa especificidade de ligação ter sido observada no modelo de SPOT para o monoclonal e o peptídeo identificado, em fase solúvel este mesmo peptídeo não foi capaz de se ligar ao anticorpo (figura 43).

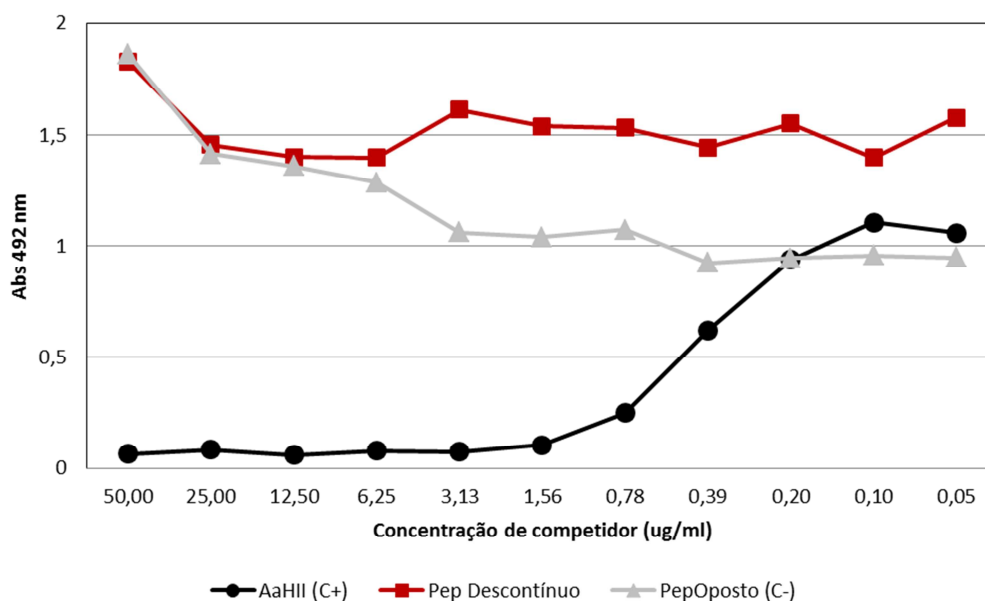


Figura 43: ELISA de competição do MAb 4C1 com o peptídeo descontínuo. Como controle positivo foi utilizada a própria toxina AaH2 e como controle negativo, um peptídeo predito na face oposta da toxina, pep9, utilizado no SPOT de controles negativos. A placa foi sensibilizada com 0,4µg/ml da toxina AaH2. 0,55 µg/ml do MAb 4C1 foram incubados por 1h a 37°C com quantidades crescentes de peptídeo ou toxina.

O peptídeo sintetizado em sua forma solúvel, acoplado a uma proteína carreadora (KLH) foi utilizado para imunizar camundongos C57BL/6. Após o ciclo de imunizações, não foi possível observar a produção de anticorpos específicos. O peptídeo controle gerou resposta humoral específica, mas estes anticorpos não reagiram cruzadamente com a toxina AaH2.

Um novo protocolo de imunização foi realizado, desta vez, porém, utilizando os peptídeos encapsulados em lipossomas. Este protocolo também se mostrou ineficiente em incitar resposta de anticorpos ao peptídeo.

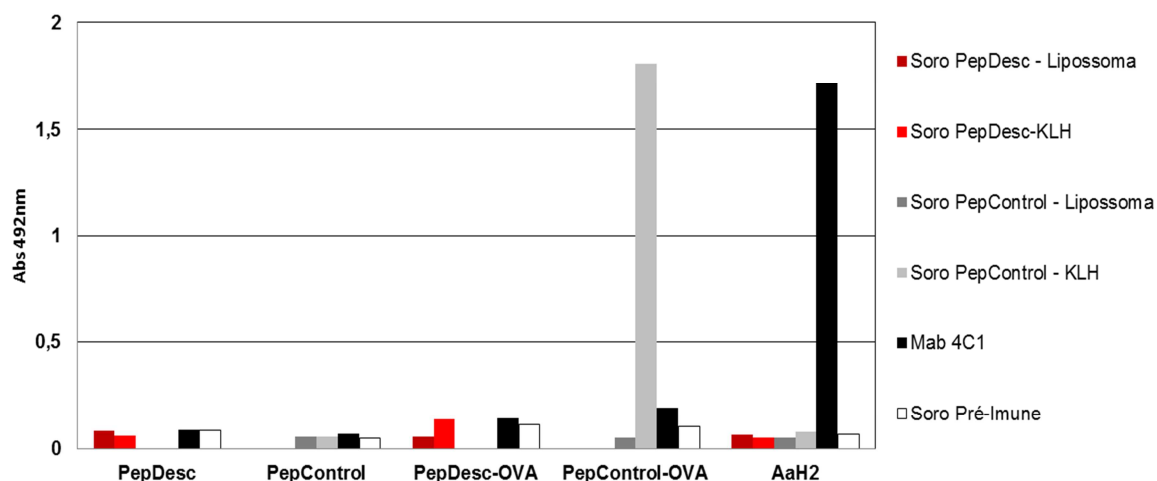


Figura 44: ELISA do soros de camundongos imunizados com o peptídeo descontínuo identificado, produzidos segundo diferentes metodologias. O par mAb 4C1 e AaH2 foram utilizados como controle positivo. Para favorecer a ligação dos peptídeos na placa, estes foram acomplados à OVA via glutaraldeído. A placa foi sensibilizada com 1µg/well de cada espécie testada (peptídeos descontínuo e controle sozinho, peptídeos descontínuo e controle ligados à OVA e AaH2) os soros testados diluídos 1:100. O mAb 4C1 foi utilizado a 0,55 µg/ml.

O algoritmo EPITOPIA, que se propõe a prever o potencial imunogênico de cada resíduo da proteína, demonstrou que, apesar da região PYG possuir uma propensão a ser imunogênico, o W mapeado foi identificado como tendo baixa propensão a imunogenicidade, o que pode explicar os resultados obtidos na imunização.

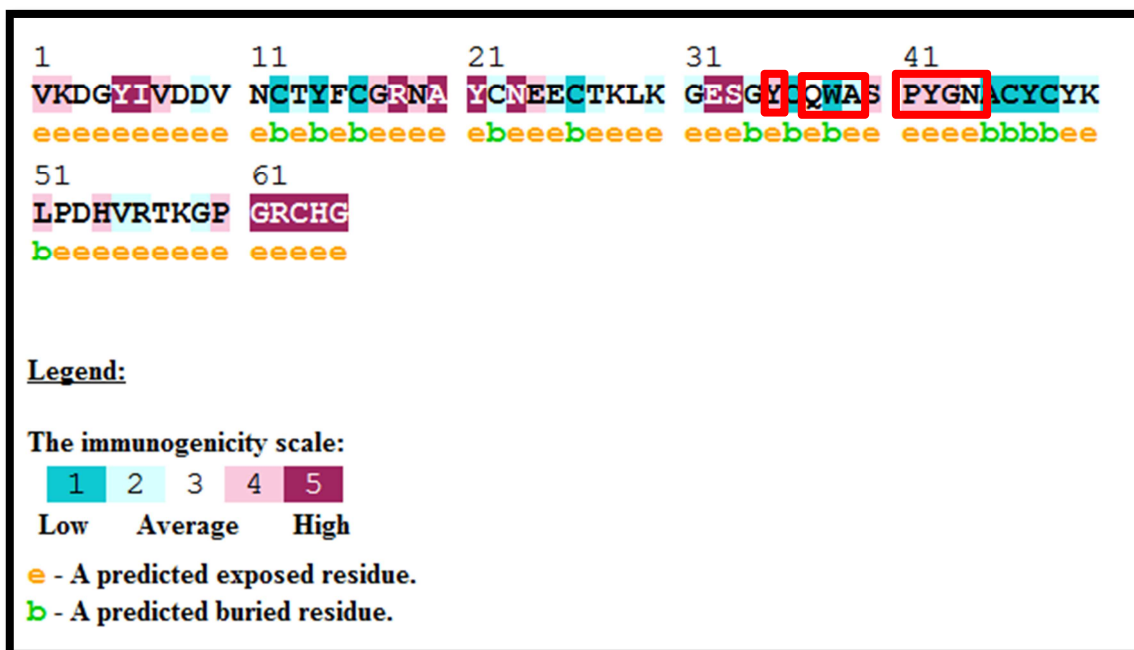


Figura 45: Predição da imunogenicidade da AaH2 feita por EPITOPIA. Os resíduos componentes do peptídeo descontínuo identificado estão destacados em vermelho.

4.4. Ts3

No período transcorrido entre a última predição feita para a AaH2 e o início desta parte do trabalho, novas metodologias para a proposição de peptídeos foram incorporadas ao PEPOP.

Baseado na teoria matemática dos grafos para resolução de problemas complexos, novos algoritmos foram propostos para otimizar a conexão entre os elementos possivelmente epitopicos da superfície da proteína. Nos métodos criados a partir destes novos algoritmos, além seriam utilizados os segmentos propostos pelo programa, pode-se utilizar os aminoácidos individuais expostos da proteína.

Outra metodologia, baseada na teoria do Alfabeto Estrutural, que descreve a estrutura local de uma proteína, proposto pelo grupo do Dr. Alexandre de Brevern (ETCHEBEST ET AL., 2005), também foi adicionada. Ela propõe a adição de aminoácidos como espaçadores para a ligação dos segmentos propostos pelo programa. O

aminoácido escolhido para fazer a ligação seria aquele cuja adição melhor adequaria a estrutura tridimensional do peptídeo à sua conformação original na proteína nativa.

Tabela 15: Segmentos acessíveis da Ts3, preditos e agrupados por PEPOP e sua posição na sequência linear da proteína.

Agrupamento	#Segmento	Tamanho	Sequência	Posição
1	10	1	K	32 - 32
	11	2	DS	34 - 35
	8	3	DKL	25 - 27
	9	2	KD	29 - 30
2	6	5	WNYDN	17 - 21
	7	1	Y	23 - 23
3	1	3	KKD	1 - 3
	15	1	Y	48 - 48
4	12	1	Y	37 - 37
	13	5	YWVHI	39 - 43
	14	1	Y	46 - 46
	2	1	Y	5 - 5
5	5	2	YI	14 - 15
6	16	17	PDSEPTKTINGKCKSGKK	51 - 67
	3	2	EY	8 - 9
	4	1	N	11 - 11

Os métodos anteriormente disponíveis em PEPOP foram mantidos e a partir da combinação de todos eles, foram determinados 16 segmentos de potencial antigenicidade na molécula de Ts3 (tabela 15), combinados em 334 peptídeos diferentes. Alguns desses peptídeos apresentaram sequências muito longas, o que inviabilizaria a sua síntese confiável pelo método de SPOT. Foram então selecionados os peptídeos preditos de até 20 aminoácidos para a síntese em membrana de SPOT, resultando um total de 260 peptídeos (tabela 16).

Para garantir a especificidade das ligações mapeadas, os anticorpos secundários a serem utilizados no mapeamento (anti-IgG de Coelho conjugada a fosfatase alcalina e anti-IgG de Camundongo conjugada à fosfatase alcalina) foram testados sozinhos com a membrana, para descartar possíveis reações cruzadas. Não foi possível detectar spots reativos. Outro ensaio, utilizando soro pré-imune de coelho também foi realizado, sem que nenhuma reação significativa fosse detectada (figura

46). Como mais uma maneira de assegurar a especificidade observada nas interações possivelmente detectadas, em todos os ensaios os tampões utilizados foram modificados para apresentarem concentração salina cinco vezes maior. A maior força iônica do tampão diminui a possibilidade de verificar-se interações inespecíficas.

A partir destas condições estabelecidas, a membrana de spot contendo os peptídeos preditos para a Ts3 foi testada com soro de coelho imunizado com veneno total de *T.serrulatus*. Nesses imunoenaios, não foi obtida reação intensa, porém foi possível distinguir spots claramente reativos (figura 47). Todos os ensaios foram repetidos para assegurar a veracidade dos resultados obtidos.

Tabela 16: Lista dos possíveis epitopo descontínuos da Ts3 preditos por PEPOP e sintetizados na membrana de SPOT.

# SPOT	Sequência	# SPOT	Sequência	# SPOT	Sequência	# SPOT	Sequência
1	KKDYDSKLY	66	YWN YDNDKLY	131	EYTNWYQYR YSW NYDN	196	LKDKDSYYYY
2	KKDAYAADSAADKLAY	67	YAAW NYDNAADKLAY	132	DKLCKDVKAKKDSY	197	NDYNW YLKDDK
3	KKDPPYGDSPQDKLY	68	YFW NYDNDKLY	133	YQYH YSDSFDKCKDVK	198	YLKDDKKS DY
4	YYDKLW NYDN	69	YDKLW NYDN	134	YRYQYQYSYVH I	199	NDYNW YDKLKD
5	YYYPQDKLYW NYDN	70	YAADKLA YAAW NYDN	135	KKDSYSDSFDKLYK	200	KKDYDSYYY
6	EYNYW NYDN	71	YPQDKLYW NYDN	136	KDSYKKDY	201	YNDYNW YME
7	EYAANAAYAAW NYDN	72	W NYDNYDKLKD	137	KAADSAAYAAKDAAY	202	DKDKLYNDYNW
8	EYENVYPW NYDN	73	YSW NYDNLKLY	138	KCDSPYKKDY	203	DSYDKKDKDKL
9	NEYW NYDN	74	YDKLYHW NYDN	139	YYWVH Y	204	YDKKDKDKL
10	NAEYAAA YAAW NYDN	75	W NYDNCYCDKCKDVK	140	YAYAAWVHAAAYAAAY	205	SDYDKKDKYE
11	NEYDYPW NYDN	76	KDKKDYSDKL	141	YYWVH YPTY	206	YNDYNW HVW Y
12	YWN YDNDKLY	77	KDKKDPYGDSPQDKL	142	YYW NYDNYDKLKD	207	YYDYD SYDKK
13	YAAW NYDNAA YADKL	78	YKDYDYDKL	143	YYFW NYDNYDKLKD	208	YVH V NYDN
14	YFW NYDNYDKL	79	YKDYDYDKL	144	KDKDSKLY	209	YYWVH V I
15	W NYDNYDKLKD	80	YYEYNYW NYDN	145	KDAKAADSAADKLAY	210	PESDPKKDYS
16	W NYDNAAYADKLA AKD	81	YYEYENVYPW NYDN	146	KDKCDSFDKLY	211	YDKDPDSEPT
17	YDKLKD KDSY	82	YYEYNYW NYDN	147	DSYYDKLYW NYDN	212	KGSKCKGN TK
18	YDKLKD KCDSPY	83	YYCSNEYDYPW NYDN	148	DSVGYYPQDKLYW NYDN	213	GSKCKGN TKT
19	DKLYW NYDNY	84	DSDKLYW NYDN	149	YMYVH I	214	SKCKGN TKTP
20	DKLAYAAW NYDNAAY	85	DSAADKLA YAAW NYDN	150	YAAAYAA YVH I	215	NNDYWVH I
21	DKLYW NYDNFVY	86	DSFDKLYW NYDN	151	KKDYDSYYY	216	YWNYYWVH I
22	KDKDSYYYI	87	YPQDKLKD KCDSPY	152	KKDPPYGVDSYYY	217	SDKDKLDDN
23	KDKCD SVYGVYYYI	88	KKDYKDKDKL	153	KSDSSYKDKPY	218	NDDKDKKDS
24	KKDKLW NYDN	89	KKDAYAAKDAADKL	154	YQYR YVH KYKY	219	PKKDYDKKDK
25	DSYYYW NYDN	90	KKDPPYKDKDKL	155	KDKVSDSTDKLY	220	DKKDSYDKKP
26	DSVGYVYYPW NYDN	91	DKLKD KDSYYY	156	YRYR YVH I	221	TPESDPKKDY
27	YYYW NYDN	92	DKLKD KCDSVYGY	157	KAKKDSYSDSHYQYQY	222	WNYYYWVH I
28	YAAAYAA YAAW NYDN	93	KKDYDSYYYI	158	KDKDSKLY	223	HVW YYYWVH I
29	YYYFW NYDN	94	KKDPPYGVDSYYYI	159	KDSDKLKD	224	YWN YVH I
30	YVH V YDYDKL	95	YYWVH MYI	160	DSDKLKD	225	CKKGN TKTY
31	YVH V YYPQDKL	96	DSYYYFW NYDN	161	DKLKD KDS	226	SKCKGN TKTP
32	YYYW NYDNY	97	KKDYDSKLY	162	YYWVH Y	227	PDSEPTKTNK
33	YAYAA YAAW NYDNAAY	98	KAAAKDA YAAADSAADKL	163	YYWVH Y	228	SEPTKTNKCK
34	YYYFW NYDN	99	KKDPPYGDSPQDKL	164	YVH V Y	229	KTNGKCKSGK
35	YDSKLYW NYDN	100	KDVKAKDSYSDSFDKLY	165	YYYWVH I	230	YYYWVH I
36	YGDSPQDKLYW NYDN	101	YKDKPYQYQYDKL	166	PDSEPTKTNKCKSGKK	231	W NYDNYDKLKD KDSYYY
37	PDSEPTKTNKCKSGKKN	102	YSYKEYTNGYSW NYDN	167	DKLKD KDSYKDK	232	KKDKLSD
38	KKDSYSDSFDKLY	103	YTYLNM EYSYSW NYDN	168	YDKLKD KDS	233	KKDYSDKLDYDY
39	YQYQYDKLYHW NYDN	104	YTYGYSW NYDNCY	169	YYDYDKLKD	234	W NYDNYLKDYYWVH I
40	EYTNWYQYR YSW NYDN	105	DSNDKLYHW NYDN	170	KKDYDYDKLKD	235	KKKDSYKDKS
41	NM EYSYSW NYDN	106	YDKLCKDVKSDSSY	171	YYYWVH I	236	ENKTYDYDKK
42	YWN YDNCYCDKLY	107	KKDSYKTKDVKLY	172	DSYYWVH I	237	KKKDYTYTKNCKS
43	W NYDNCYCDKCKDK	108	DKLCKDVKSDSSYSYKY	173	YVH V YW NYDN	238	KKKDYTYTKNCKSGKK
44	YCDKCKDVKSDSSY	109	KKDSYSDSHYQYGYI	174	YWN YDNDKLY	239	PEPTKCNCKSGKK
45	DKLYHW NYDNKY	110	YQYR YVH KYGYI	175	KKDYYYWVH I	240	KKKDYTYTKNCKSG
46	KDVKSDSSYSYKYKYI	111	DSHYQYQYGYSW NYDN	176	EYW NYDNY	241	KKDYNW
47	KTKDVKLYHW NYDN	112	KAKKDSYSDSFDKLY	177	EYDKKDYDS	242	DYSDDYNW
48	DSYSYKYKYSW NYDN	113	KKDYDSKLYK	178	YWN YDNDKLYK	243	W NYDCKK
49	YQYQYGYSW NYDN	114	KKDPPYGDSPQDKLKD	179	W NYDNDKLYK	244	W NYDSDYKPE
50	YVH V YQYQYDKL	115	KKDYDYDKL	180	KKDYYYW NYDN	245	W NYDYTP EP
51	YSYTYSW NYDNCY	116	KKDYVGYVYYPQDKL	181	YVH V W NYDN	246	EPKDYDYTYTK
52	YSDSFDKLYHW NYDN	117	EYNYW NYDN	182	W NYDNYYYWVH I	247	DYSDYTYTKNCK
53	YYDKLYNDYNW	118	EYENVYYPW NYDN	183	KKDYDSYYWVH I	248	DYSDYTYTK
54	EYNYWVH Y	119	DKLKD KDKLY	184	DSLKD KDK	249	W NYDYTYTK
55	EYAANAAYAAHVW Y	120	DKLA AKDAKAAKDAY	185	LKDKDKS	250	W NYDYTYTKNCK
56	YHVW YDYDKK	121	DKLKD KDKPY	186	KDKDKLKD	251	DYSDYTYTKNCKS
57	W NYDNYLKDSD	122	YYDYSDKLYK	187	KDSLKD	252	KKKDYTYTKNCK
58	W NYDNAAYALKDAASD	123	YYPYGDSPQDKLKD	188	HVW YYY	253	ENKTP EPKYS
59	YDKSDYDKK	124	YYYWVH I	189	YYHVW Y	254	SYKPEPTNCK
60	YALKDAASDAADKLY	125	YAAAYAA YAA YVH I	190	YHVW Y	255	SYKPEPTNCKSGKK
61	DKLYNDYNW Y	126	KKDYDSKLY	191	YHVW Y	256	DKKPEPTNCKSGKK
62	DKLAYAANDYNWAA Y	127	KKDAYAADSAADKLA AK	192	DKLKD KDSYDKK	257	DEPTKCNCKSGKK
63	KKDKLSDYDKK	128	KKDPPYGDSPQDKLKD	193	KKGSKCKGN TKTPESDP	258	EPKCNCKSGKK
64	YVH V YYY	129	KKDSYSDSFDKCKDVK	194	YHVW YYY	259	HW YYYKCNCKSGKK
65	YVH V AAFAAYAAAY	130	KKDSYQYQYDKL	195	NDYNW YLKD	260	PTKCNCKSGKK

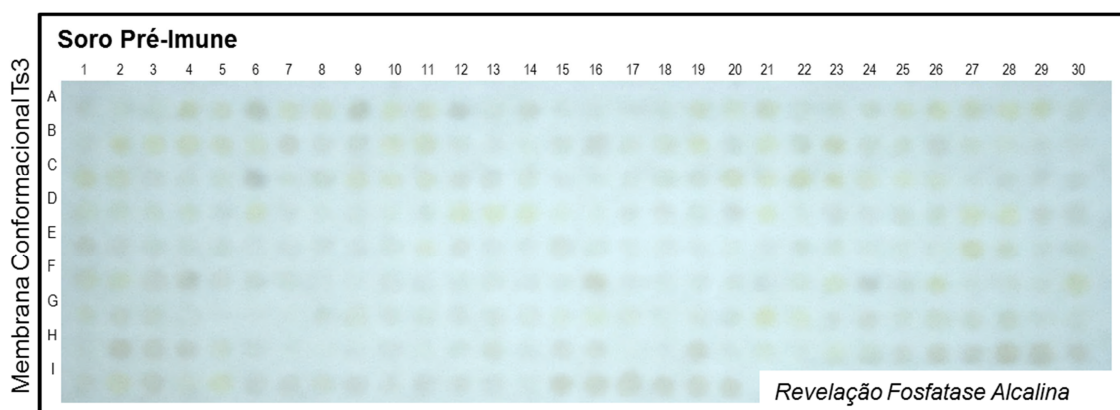


Figura 46: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com soro de coelho pré-imune. O soro foi utilizado diluído 1:500 e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina em diluição 1:4000

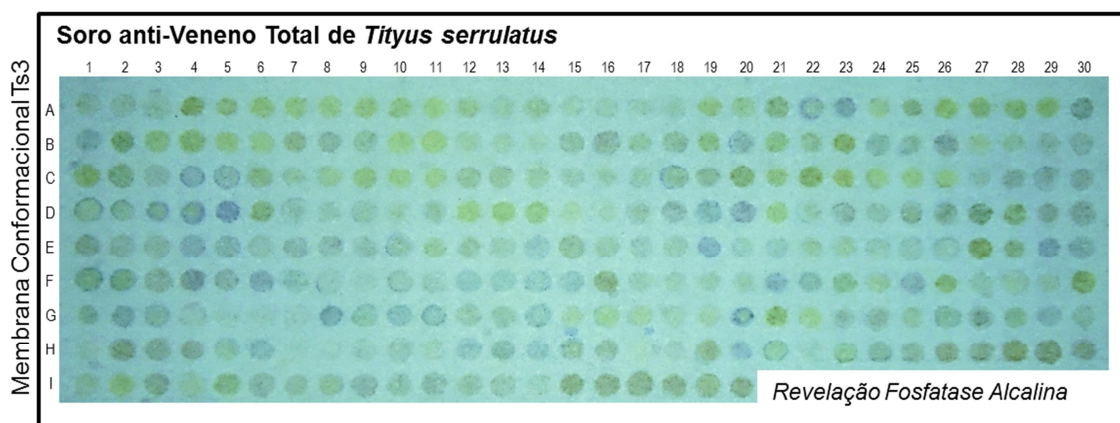


Figura 47: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com soro de coelho anti-veneno total de *T.serrulatus*. O soro foi utilizado diluído 1:500 e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina em diluição 1:4000

A grande maioria dos peptídeos com os quais foi considerada interação positiva, ainda que fraca, com o soro anti-veneno total (17 de 19 spots positivos) apresentaram o segmento 13 em sua composição. Esse segmento, YWVHI foi acompanhado invariavelmente de pelo menos dois resíduos de tirosina (segmentos 2, 7, 12 e 14). O segmento 5 (YI) também se mostrou frequente nos peptídeos reativos (tabela 17).

Tabela 17: Lista dos peptídeos Ts3 preditos por PEPOP reativos com soro anti-veneno total de *T.serrulatus*. Estão mostradas a posição, sequência e composição dos peptídeos reativos.

As sequências destacadas em vermelho apresentam o segmento 13.

SPOT	Sequência	aa	Segmentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A23	KDKCDSVYGvYyYyI	14	9+10+11+15+14+2+5																
A30	YwVHIYYDKL	11	13+2+14+12+8																
B 1	YwVHIYYYPQDKL	13	13+2+14+12+8																
B26	YIIHVWYyYDKK	12	5+13+14+2+1																
C 4	YwVHIYYyY	10	13+5+2+14+12																
D 5	YyYwVHIYYI	10	12+14+13+2+5																
D20	YQYRYwVHIKYGYI	14	12+14+13+2+5																
E 4	YIYYyYwVHI	10	5+2+14+12+13																
E19	YyYwVHIYY	10	2+14+13+5+7																
E29	YIYYwVHI	8	5+14+13																
E30	YIAAAyAAyWVHI	13	5+14+13																
F 4	YQYRYwVHIKYIKY	14	2+14+13+5+7																
F 6	YIRYRYwVHI	10	5+14+13																
F21	YyYyWVHIYYI	10	2+14+12+13+5																
F25	KKDYyYyWVHI	11	10+9+7+12+14+13																
G 2	WNYDNYyYyWVHI	13	6+7+12+14+13																
G 8	IHVYyYyY	8	13+2+14+12																
G20	KKDYDSYyYyY	11	1+15+11+12+14+2+5																
G29	YyYIYYwVHI	10	12+14+2+5+13																

Como a reação apresentada neste ensaio não foi muito intensa, um soro específico contra a Ts3 foi preparado para ser utilizado no mapeamento. Primeiramente, para a purificação da toxina do veneno de *T. serrulatus*, foi feita a filtração molecular em coluna Sephadex G-50, seguindo método já estabelecido (MIRANDA ET AL., 1970). Excetuando-se a fração FI, as demais foram agrupadas e novamente purificadas em HPLC (figura 48).

A Ts3 foi encontrada pura, no pico destacado na figura 48 A, tendo sua massa e pureza confirmada por espectrometria de massa. Conforme já esperado, esta toxina representou apenas uma pequena parcela do veneno, sendo necessárias várias purificações para se chegar às quantidades necessárias para a imunização.

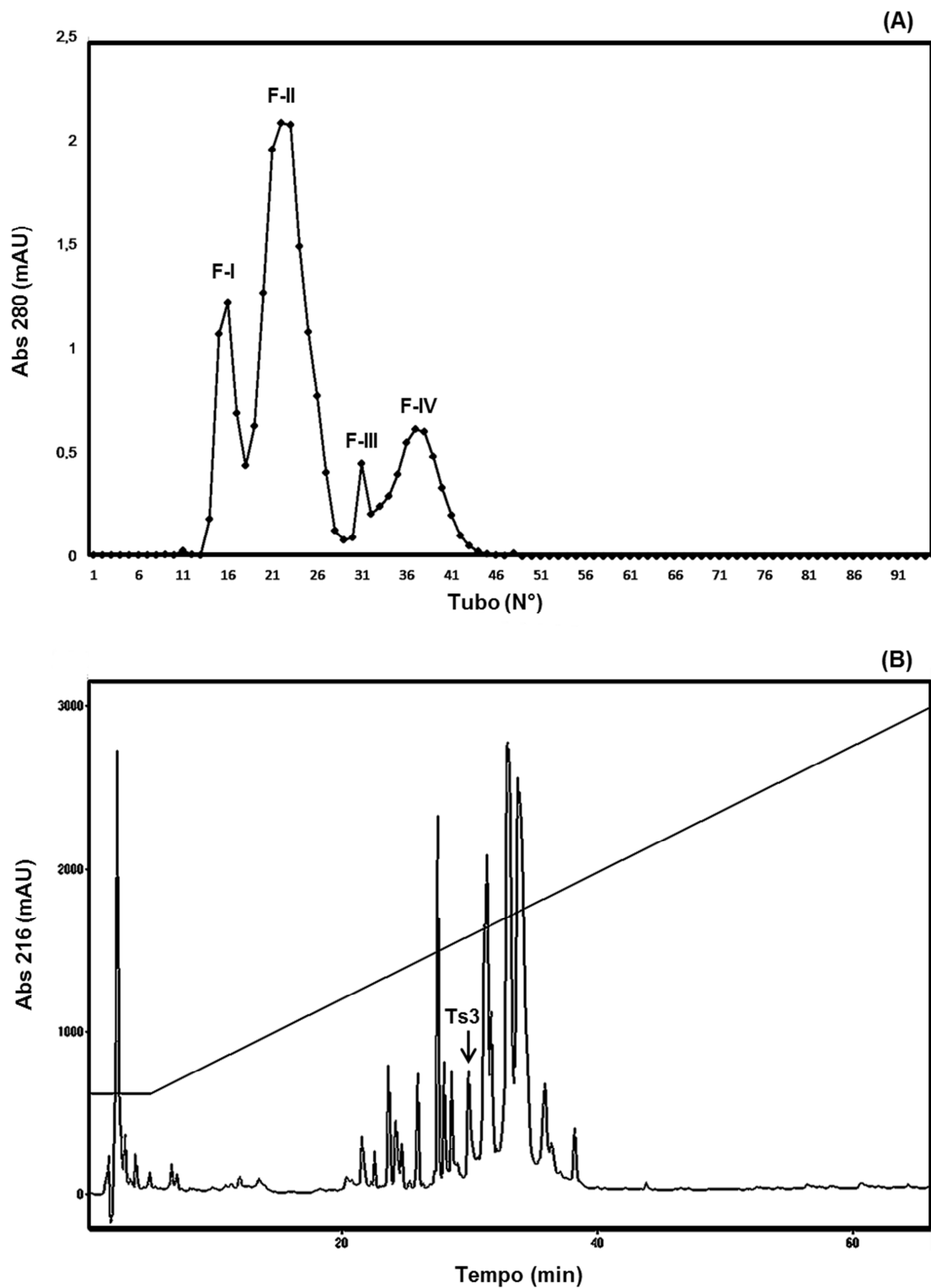


Figura 48: Purificação da Ts3 a partir do veneno bruto de *T.serrulatus*. (A) Gel filtração do veneno bruto em coluna Sephadex G-50. (B) Purificação em HPLC das frações II, III e IV da gel-filtração. Foram aplicados aproximadamente 400µg.

De posse da toxina purificada, grupos de quatro camundongos receberam a toxina emulsionada em adjuvante de Freund, visando a sua detoxificação. Foram feitos dois grupos, um recebendo 1 μg de toxina por dose e outro, 10 μg , a quantidade padronizada em nosso laboratório para imunização com proteínas inteiras. Apesar do grupo imunizado com menor quantidade ter demorado mais para alcançar um título satisfatório de anticorpos, este foi estabelecido devidamente ao fim do protocolo de imunização. O estabelecimento de protocolos eficientes que utilizem menor quantidade de toxinas é interessante devido a escassez e toxicidade do material.

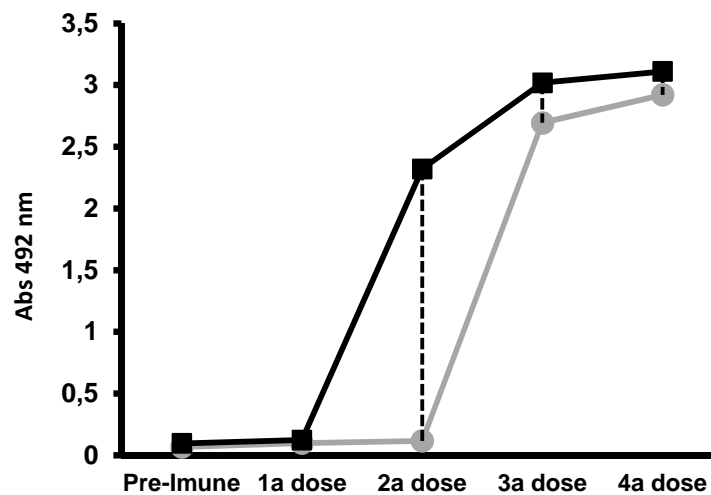


Figura 49: Resposta, medida por ELISA, dos grupos de camundongos à imunização com Ts3 purificada, em adjuvante de Freund. A placa foi sensibilizada com 100 μl de solução contendo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ts3. Os soros foram diluídos 1:100. A linha preta corresponde ao grupo imunizado com 10 μg de toxina e a linha cinza corresponde ao grupo imunizado com 1 μg de toxina.

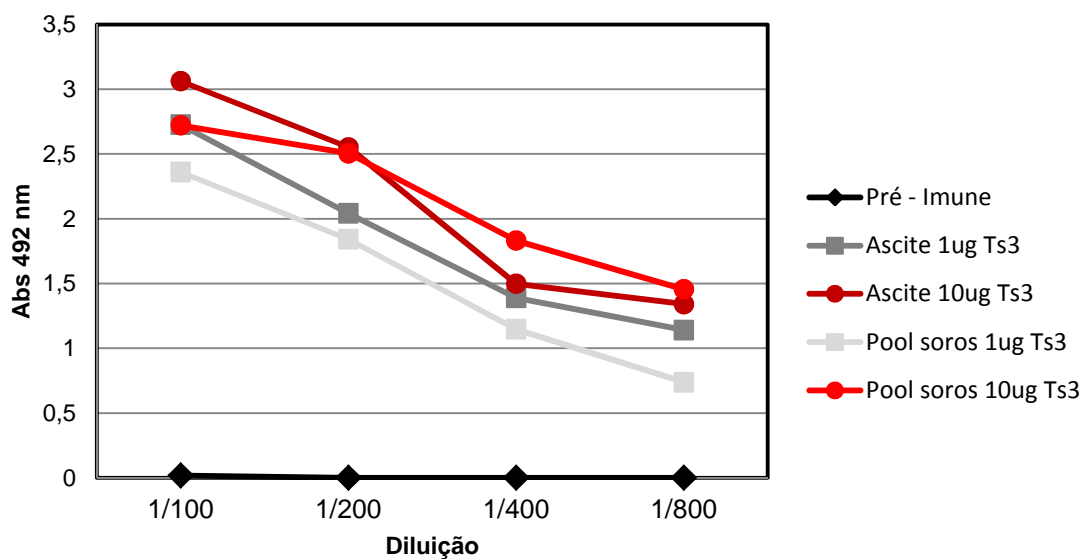


Figura 50: ELISA do soro e ascite dos animais imunizados com Ts3. A placa foi sensibilizada com 100 µl de solução contendo 10 µg/ml de Ts3.

Após a constatação de título satisfatório, os camundongos receberam mais uma dose de Ts3 em adjuvante de Freund, visando o reforço do título, e sua sangria total foi realizada. Além disso, os camundongos desenvolveram naturalmente ascite, após o recebimento da última dose intraperitoneal. Por se tratar de um fluido rico em anticorpos, conforme assegurado por ELISA (figura 50), a ascite foi recolhida e parte foi utilizada para purificar IgGs específicas em coluna de proteína A.

Para verificar o potencial neutralizante dos anticorpos produzidos, estes foram utilizados em ensaio de proteção *in vivo*, utilizando 100µl da ascite pré-incubadas com 2 DL50 do veneno total de *T.serrulatus*. Como controle negativo, foi utilizado 100 µl de soro pré-imune. Os anticorpos presentes na ascite desenvolvida após imunização com 10 µg de veneno foi capaz de conferir uma proteção de 75% contra o desafio (tabela 18).

Tabela 18: Desafio in vivo de camundongos Balb/c imunizados com Ts3, com 2 DL50 do veneno total de *T.serrulatus*.

Grupo	Imunógeno	Sobrevivência
1	Controle	0/4
2	Ts3 – 1 µg	1/4
3	Ts3 - 10 µg	3/4

As imunoglobulinas específicas purificadas em coluna de proteína A foram então testadas em imunoenensaio com a membrana contendo os peptídeos preditos por PEPOP para a Ts3, a 50 µg/ml. De fato, a reação obtida com a IgG purificada anti-Ts3 foi mais intensa, sendo possível identificar vários peptídeos reativos (figura 51).

Analisando-se as sequências dos peptídeos reativos foi possível observar que os mesmos segmentos identificados na reação com o soro anti-veneno total de *T. serrulatus* também foram frequentes nos peptídeos reativos com o soro específico. Outro segmento, porém, também pareceu ser importante para a ligação, o segmento 6, WNDNY (tabela 19).

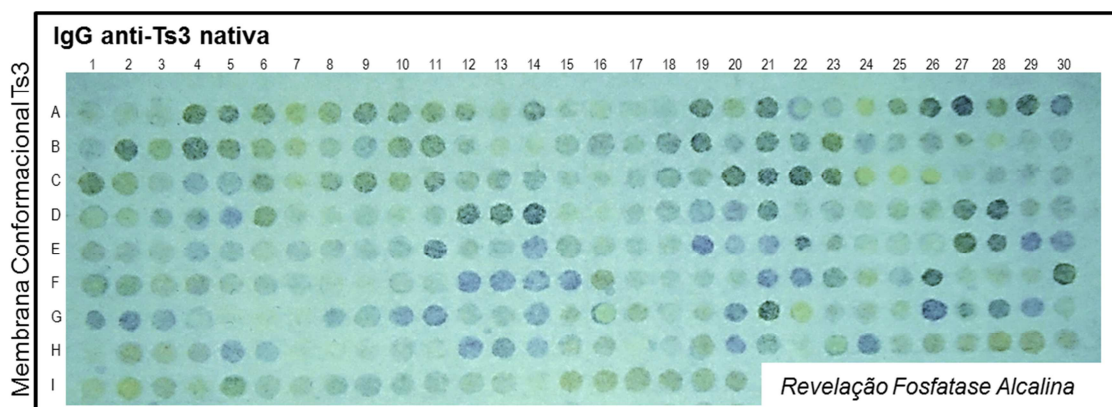


Figura 51: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com IgG de camundongo anti-Ts3. A IgG foi utilizada a 50 µg/ml e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina em diluição 1:4000.

Analisando a proporção da presença destes segmentos no total de peptídeos preditos, foi possível estabelecer que a frequência dos segmentos 2, 5, 12, 13 e 14 foi significativamente maior nos peptídeos identificados como reativos nos imunoenaios de spot, tanto com o soro anti-veneno total de *T.serrulatus* quanto com a IgG anti-Ts3. O segmento 6 apresentou frequência maior do que a predita para os peptídeos reativos com os anticorpos específicos anti-Ts3 (tabela 20 e figura 52).

Em sua tese de doutorado, o Dr. Ricardo Andrez Machado da Ávila, membro da nossa equipe, também se propôs a estudar epitopos descontínuos de diversas proteínas, porém pelo viés da Bioinformática. Neste trabalho, foi proposto que um alto ponto isoelétrico seria característica dos peptídeos reativos, sendo um fator importante nas interações com anticorpos (dados não publicados). Analisando este parâmetro para os peptídeos derivados da Ts3 identificados, não foi possível reproduzir tal observação. Apesar da média do pI dos peptídeos reativos ser levemente maior do que a de peptídeos não reativos, esta diferença não foi significativa, sendo que uma ampla faixa de pI pode ser observada nos dois grupos (figura 53).

Tabela 19: Lista dos peptídeos Ts3 preditos por PEPOP reativos com IgG anti-Ts3. Estão mostradas a posição, sequência e composição dos peptídeos reativos. As sequências para as quais não foram designados segmentos foram montadas a partir da união de aminoácidos individuais expostos.

SPOT	Sequência	aa	Segmentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A19	DKLYWNYDNY	10	8+7+6+12																
A21	DKLYWNYDNFVY	12	8+7+6+12																
A26	DSVYGVYYYIPWNYDN	16	11+15+14+2+5+6																
A27	YYYYIWNVDN	10	12+14+2+5+6																
A30	YWVHIYYDKL	11	13+2+14+12+8																
B 2	YYYIWNVDNY	10	14+2+5+6+7																
B 4	YYYIPWNYDNY	11	14+2+5+6+7																
B18	DSSYSYKYYKYSWNYDN	17	11+15+14+2+5+6																
B19	YQYQYGYISWNYDN	14	12+14+2+5+6																
B21	YSYTYISWNYDNCY	14	14+2+5+6+7																
B24	EYNYIIVHWY	10	3+4+5+13																
C 4	YWVHIYYYY	10	13+5+2+14+12																
C20	YYEYNIWNYDN	12	14+2+3+4+5+6																
C21	YYEYENVYIPWNYDN	15	14+2+3+4+5+6																
C22	YYNEYIWNVDN	12	14+2+4+3+5+6																
D 5	YYYWVHIYYI	10	12+14+13+2+5																
D12	YSYKEYTNGYISWNYDN	17	14+2+3+4+5+6																
D13	YTYLNMEYSYISWNYDN	17	14+2+4+3+5+6																
D14	YTYGYISWNYDNCY	14	14+2+5+6+7																
D19	KKDSYSDSHYQYQYGYI	17	1+15+11+12+14+2+5																
D20	YQYRYWVHIKYGYI	14	12+14+13+2+5																
D21	DSHYQYQYGYISWNYDN	17	11+12+14+2+5+6																
D27	EYNYIWNVDNY	12	3+4+2+14+5+6																
D28	EYENVYYYIPWNYDN	15	3+4+2+14+5+6																
E 4	YIYYYYWVHI	10	5+2+14+12+13																
E11	EYTNWYQYRYISWNYDN	17	3+4+2+14+5+6																
E14	YIRYQYQYSYWVHI	14	5+2+14+12+13																
E19	YYYWVHIYYI	10	2+14+13+5+7																
E20	YAYAAYWVHIAAAYIAAY	18	2+14+13+5+7																
E21	YYYWVHIYIPTY	12	2+14+13+5+7																
E22	YYYIWNVDNYDKLKD	15	12+14+5+6+7+8+9																
E28	DSVYGYYPQDKLYWNYDN	18	11+15+14+12+8+7+6																
E29	YIYYWVHI	8	5+14+13																
E30	YIAAAYWVHI	13	5+14+13																
F12	YYYWVHIY	8	14+12+13+2																
F13	YYWVHIYY	8	12+13+2+14																
F14	YWVHIYYY	8	13+2+14+12																
F15	YYYYWVHI	8	2+14+12+13																
F21	YYYWVHIYI	10	2+14+12+13+5																
F22	DSYYYYWVHI	10	11+15+14+12+13																
F26	EYIWNVDNY	10	3+5+6+7																
G 1	YWVHIYIWNVDN	12	13+5+6																
G 2	WNYDNYYYWVHI	13	6+7+12+14+13																
G 3	KKDYDSYYYWVHI	13	1+15+11+12+14+13																
G 8	IHVWYIII	8	13+2+14+12																
G10	YIHWYIII	8	14+12+13+2																
G11	YIHWYIII	8	12+13+2+14																
G14	IYHWYIII	10	5+13+12+14+2																
G20	KKDYDSYYYIY	11	1+15+11+12+14+2+5																
G26	NDYNWVHWY	10	6+13																
G28	YWVHIWNYDN	10	13+6																
G29	YYYIYYWVHI	10	12+14+2+5+13																
H 5	NNDYYYWVHI	10	*****																
H 6	YWNYYYWVHI	10	*****																
H12	WNYYYYWVHI	10	*****																
H13	IHWYIYNWY	10	*****																
H14	YWNVWVHIY	10	*****																
H20	YYYWVHI	7	2+14+13																
H24	WNYDNYLKDYYWVHI	15	6+7+8+12+13																

Tabela 20: Lista dos segmentos de Ts3 preditos por PEPOP que se mostraram mais reativos nos imunoenaios de SPOT. Os segmentos mais frequentes estão destacados em preto.

Soro Anti-Veneno Total TS	IgG Anti-Ts3
Seg1 (CL3) - KKD	Seg1 (CL3) - KKD
Seg2 (CL4) - Y	Seg2 (CL4) - Y
Seg3 (CL6) - EY	Seg3 (CL6) - EY
Seg4 (CL6) - N	Seg4 (CL6) - N
Seg5 (CL5) - YI	Seg5 (CL5) - YI
Seg6 (CL2) - WNYDN	Seg6 (CL2) - WNYDN
Seg7 (CL2) - Y	Seg7 (CL2) - Y
Seg8 (CL1) - DKL	Seg8 (CL1) - DKL
Seg9 (CL1) - KD	Seg9 (CL1) - KD
Seg10 (CL1) - K	Seg10 (CL1) - K
Seg11 (CL1) - DS	Seg11 (CL1) - DS
Seg12 (CL4) - Y	Seg12 (CL4) - Y
Seg13 (CL4) - YWVHI	Seg13 (CL4) - YWVHI
Seg14 (CL4) - Y	Seg14 (CL4) - Y
Seg15 (CL3) - Y	Seg15 (CL3) - Y
Seg16 (CL6) - PDSEPTKTNGKCKSGKK	Seg16 (CL6) - PDSEPTKTNGKCKSGKK

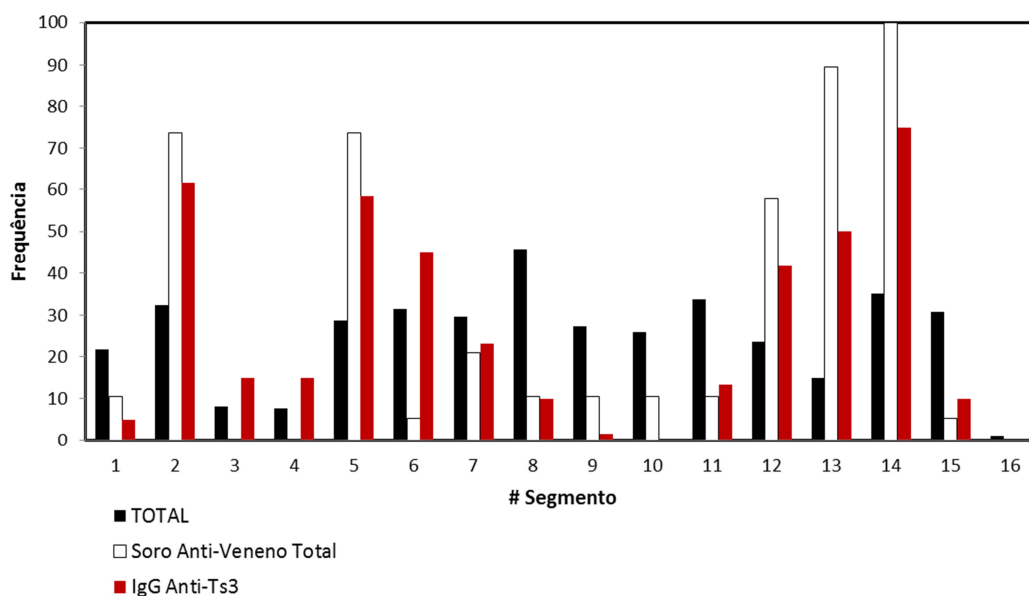


Figura 52: Gráfico da proporção de segmentos presentes nos peptídeos totais preditos para a Ts3, nos SPOTs reativos com cada anticorpo.

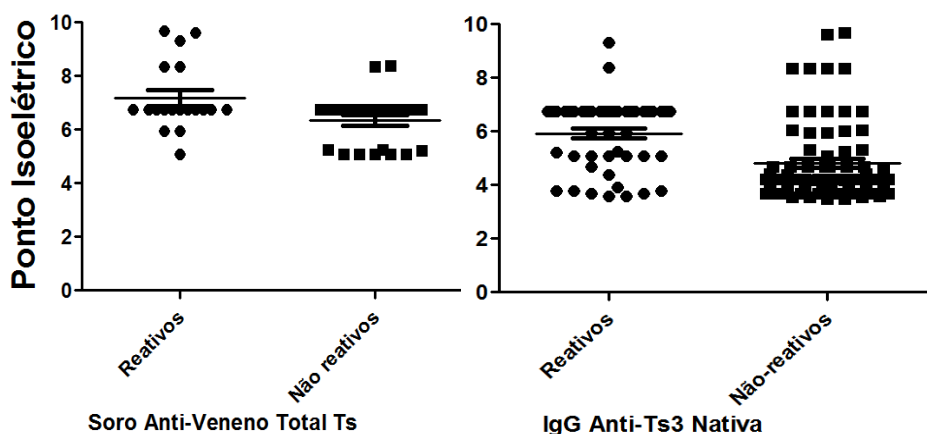


Figura 53: Gráfico demonstrando os valores de ponto isoelétrico para os peptídeos preditos para a Ts3.

Os segmentos mais reativos da Ts3 identificados foram localizados no modelo da estrutura tridimensional da molécula. O segmento 6 se localizou no loop que se conecta à α -hélice e o segmento 13 também correspondeu a um loop, que interliga as fitas- β . Essa região é condizente com o domínio central (“core domain”), participante da face bioativa inferida para as α -toxinas (figura 54).

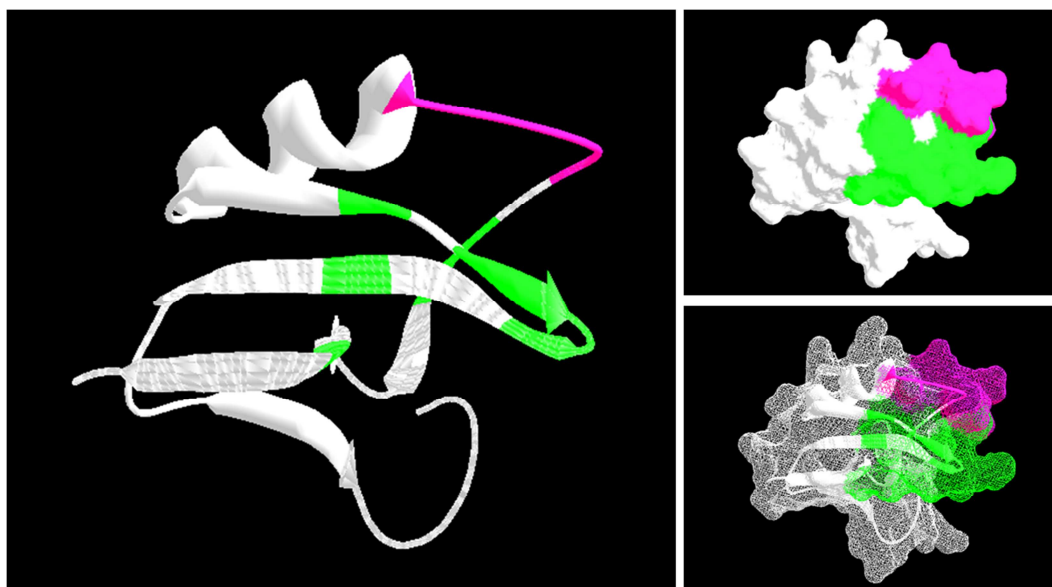


Figura 54: Localização espacial dos segmentos reativos identificados na superfície do modelo tridimensional da Ts3. O segmento 6 está mostrado em rosa e o segmento 13 mais as tirosinas, em verde. As figuras menores mostram o mesmo modelo, porém em modelo cheio.

Utilizando-se a predição de imunogenicidade feita através da ferramenta EPITOPIA, o segmento 6 foi caracterizado como possuidor de um alto potencial imunogênico enquanto o segmento 13 não, segundo esta predição (figura 55).



Figura 55: Predição da imunogenicidade da Ts3 feita por EPITOPIA. Os resíduos componentes dos segmentos reativos estão destacados em vermelho.

Uma versão recombinante da Ts3 foi produzida como dissertação de mestrado de Anderson Oliveira do Carmo, orientado pelo Dr. Evanguedes Kalapothakis, da Universidade Federal de Minas Gerais e esta foi utilizada para produzir um soro de coelho específico. O soro, entretanto, não apresentou propriedades neutralizantes. Uma das possibilidades levantadas para explicar a falta de neutralização foi que a Ts3rec produzida não teria se enovelado corretamente, e teria sido capaz de suscitar apenas anticorpos dirigidos contra porções lineares da proteína. Para testar esta hipótese, o soro de coelho anti-Ts3rec, gentilmente cedido pelo Dr. Kalapothakis, foi utilizado em imunoenaios com a membrana contendo os possíveis epitopos descontínuos preditos por PEPOP para a Ts3 (figura 56)

De fato, o soro foi capaz de reconhecer significativamente apenas dois spots. Ao analisar a sequência destes dois peptídeos, deparamo-nos com duas sequências aparentemente lineares e parcialmente sobrepostas: PDSEPTKTNG e SEPTKTNGKC. Estas sequências lineares integraram a predição de epitopos conformacionais devido a um artefato do programa, que ao utilizar o método recentemente implementado de ligação de aminoácidos individuais, otimizando o caminho de ligação entre eles, levou a formação de sequência idêntica ao fragmento linear da proteína.

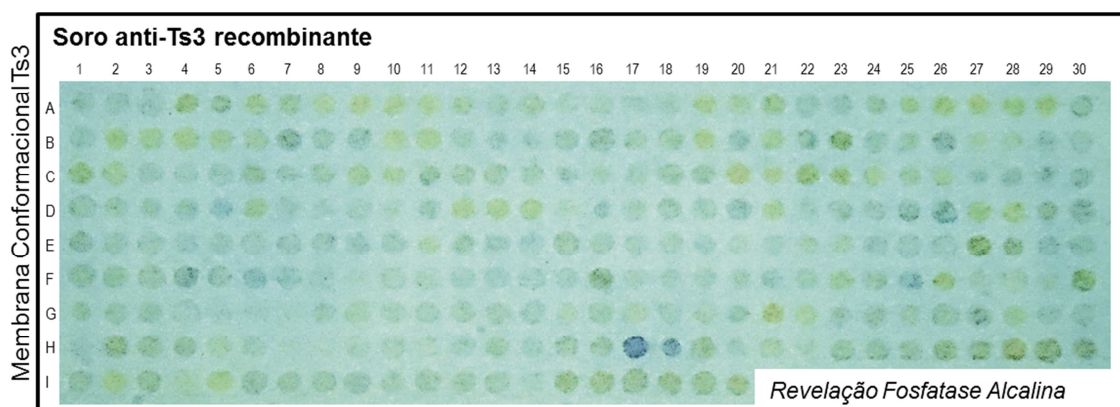


Figura 56: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos preditos para a Ts3 com soro de coelho anti-Ts3rec. O soro foi utilizado a diluição de 1:500 e o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina em diluição 1:4000.

O soro anti-Ts3rec foi então testado com membrana contendo peptídeos sobrepostos derivados da sequência linear da Ts3. Os outros anticorpos testados previamente também foram utilizados para a verificação da ligação com os peptídeos lineares (figura 57). O soro anti-veneno total e a IgG anti Ts3 nativa reconheceram apenas fracamente peptídeos lineares que continham os segmentos já identificados na predição (YWVHI e WNYDN). A reação foi notavelmente mais fraca, indicando ser necessária a presença de outros elementos para a reação, sendo um indício de que esses segmentos de fato são componentes de um epítipo do tipo descontínuo. O soro anti-Ts3rec apresentou reação notavelmente mais intensa com peptídeos lineares, sendo um indício de que realmente a toxina recombinante apresentou enovelamento incorreto.

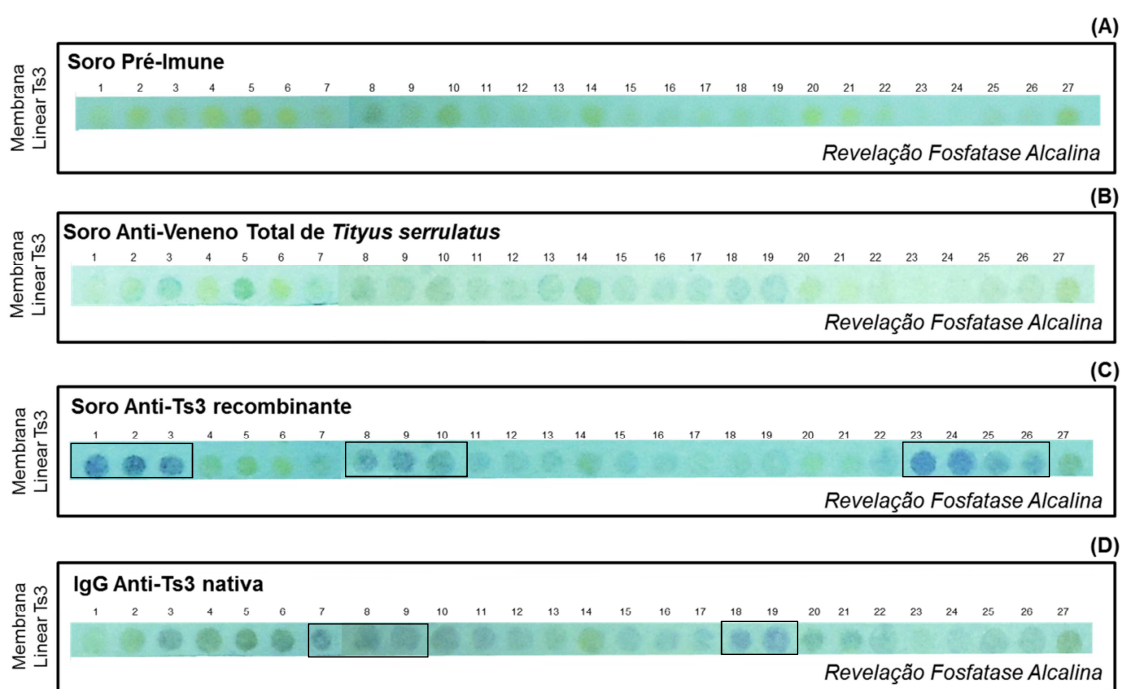


Figura 57: Reação da membrana de SPOT contendo peptídeos sobrepostos derivados da sequência linear da Ts3 com diferentes soros. Os soros foram utilizados a diluição de 1:500 e a IgG anti-Ts3 nativa a 50 µg/ml. O anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina em diluição 1:4000.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As toxinas escorpiônicas para canais para sódio, sujeito deste estudo, são proteínas solúveis e, quando inoculadas na corrente sanguínea de um mamífero, mantêm a sua conformação para exercício de sua atividade tóxica. Desta maneira, é provável que anticorpos gerados contra essas toxinas sejam, em sua maioria, direcionados para epitopos presentes na superfície de sua estrutura 3D, do tipo descontínuo (VAN REGENMORTEL 1996).

No campo da Toxinologia, são escassos os trabalhos que visam identificar epitopos descontínuos nos componentes tóxicos de venenos. Alguns estudos atestam, entretanto, que anticorpos capazes de se ligarem a epitopos descontínuos na superfície das toxinas seriam mais propensos a apresentarem propriedades neutralizantes da atividade tóxica destas. O fato foi constatado através de estudos com anticorpos monoclonais, aparentemente direcionados a epitopos descontínuos, que apresentam de fato maior eficiência de neutralização do que aqueles direcionados a epitopos lineares (DEVAUX ET. AL., 1997), (ALVARENGA ET. AL., 2005), (GRANIER ET. AL., 2009).

A primeira parte deste trabalho teve como objetivo mapear possíveis epitopos descontínuos da TsNTxP, através de uma adaptação do método de SPOT, utilizando soro de coelho produzido contra a toxina purificada. Foram identificadas duas porções mais reativas: a porção da extremidade N-terminal (GREGYPAD) e os resíduos 47-54 do C-terminal (GLPDSVKI), que, quando combinadas, apresentaram a maior reatividade verificada no ensaio.

O mapeamento sistemático de epitopos lineares feito em trabalhos prévios, já havia identificado os 15 primeiros resíduos da proteína (GREGYPADSHGCKIT) e a porção C-terminal dos resíduos 47–61 (GLPDSVKIWTSETNK) como regiões antigênicas em diversos modelos animais testados (MENDES, ET AL., 2004). Quando uma mistura desses dois peptídeos, acoplada ao KLH, foi utilizada para imunizar camundongos, e os animais foram desafiados com doses correspondentes a 1 DL50 e 1 DL100 da fração tóxica do veneno (TsFG50), uma proteção de 75% e 65%, respectivamente foi

alcançada, evidenciando o potencial dessas regiões em gerar anticorpos neutralizantes.

Alguns diferentes formatos já foram propostos para o mapeamento de sítios de ligação descontínuos pela técnica de SPOT. Aplicando este conhecimento para o mapeamento de epitopos descontínuos, foram preparados peptídeos derivados da sequência da TsNTxP, com 18 resíduos cada, contendo uma sequência de 8 resíduos de uma parte da TsNTxP ligados por um espaçador de duas glicinas a uma outra sequência de 8 resíduos de uma parte distinta dessa mesma molécula, visando a aproximação de regiões que se encontram distantes na sequência linear da proteína. Uma análise combinatória produziu sequências peptídicas distintas, cobrindo todas as possibilidades de associação (tabela 2). Peptídeos controle, contendo apenas uma sequência derivada da TsNTxP associada a uma sequência irrelevante, também foram definidos, totalizando em 153 peptídeos que foram então sintetizados em membrana de celulose e testados com o soro de coelho anti-TsNTxP de propriedades neutralizantes.

As regiões identificadas neste ensaio (resíduos 1-8 e 46-54) como sendo as mais reativas, principalmente quando combinadas, estão distantes uma da outra na estrutura primária da proteína, mas baseando-se no modelo da estrutura 3D da TsNTxP, elas se encontram próximas, podendo formar um único epitopo descontínuo em sua superfície (figuras 23 e 25). As regiões N-terminal e C-terminal podem, em conjunto, formar um sítio único de reconhecimento para anticorpos, uma vez que a modelagem indica que a distância média entre os C α dos resíduos que constituem essa região identificada está na faixa de $8.0 \pm 1.7 \text{ \AA}$, condizente com a área média já identificada para interações proteína-proteína (CHAKRABARTI & JANIN, 2002).

Este possível epitopo descontínuo mapeado correspondeu a um epitopo neutralizante, conforme demonstrado pela capacidade do peptídeo sintético cognato de induzir anticorpos neutralizantes em camundongos Balb/c (tabela 4). Esse achado é consistente com vários dados prévios da literatura. O papel da porção N-terminal de toxinas escorpiônicas na geração de anticorpos neutralizantes já havia sido destacado

(DEVAUX ET AL., 1993). Resíduos do 1-8 e 47-54 pertencem ao denominado domínio NC, que foi postulado como parte integrante da ligação de α -toxinas a canais para sódio voltagem-dependentes (KARBAT ET AL., 2004). Assim, anticorpos que reconhecem peptídeos da região C-terminal das toxinas escorpiônicas tendem a apresentar propriedades neutralizantes uma vez que essa região participa do possível sítio ativo das neurotoxinas escorpiônicas (GUREVITZ ET AL., 2001), (COHEN ET AL., 2004), (YE ET AL., 2005). Um mAb produzido contra a toxina Cn2, de *Centruroide noxius* é reativo contra um peptídeo sintético que mimetiza uma região descontínua que associa os resíduos 3-15 e 54-66 (HERNANDEZ ET AL., 2002).

As regiões identificadas no presente estudo se mostraram relativamente conservadas na estrutura primária das toxinas escorpiônicas. Quando a sequência do epitopo descontínuo identificado foi alinhada com as porções correspondentes nas principais toxinas do veneno de *T.serrulatus*, apresentando identidade de 50% com Ts2, 56% com Ts1, 50% com Ts3 e similaridade de 81% com Ts2, 75% com Ts1 e 69% com Ts3 (figura 22). Sequências consenso estão de fato presentes em ambas as partes do epitopo, o que pode contribuir para o reconhecimento de várias toxinas pelos anticorpos desenvolvidos contra o peptídeo correspondente.

As sequências primárias da Ts1, Ts2 e Ts3, na região correspondente ao epitopo identificado, possuem conteúdo idêntico de distribuição de resíduos carregados positivamente (K/R) ou negativamente (D/E). A presença de resíduos carregados é importante para a interação entre proteínas (KESKIN ET AL., 2005), (BURGOYNE & JACKSON, 2006). Especialmente neste caso, cinco resíduos carregados participam do epitopo neutralizante identificado. A importância da Asp8 para a interação com anticorpos anti-TsNTxP neutralizante já foi também ressaltada (CHAVEZ-OLORTEGUI ET AL., 2001). O ensaio de ALA-Scan, onde cada resíduo da sequência do peptídeo é alterado, para verificar a importância deste para a ligação com o anticorpo, ressaltou mais uma vez a importância de Asp8, uma vez que a sua alteração foi capaz de abolir quase 70% da reatividade do com anticorpos de camundongo anti-peptídeo (figura 26).

A alteração da Tyr5 também produziu efeito semelhante. Este resíduo se mostrou o único resíduo indispensável para a ligação com anticorpos de todos os animais contra a TsNTxP (MENDES ET AL., 2004). Na toxina AaH2, a cadeia lateral de Tyr5, juntamente com outros resíduos, demonstrou ser um grupamento químico de grande importância para a interação com o canal (DEVAUX ET AL., 1996). Sun e colaboradores, em 2003, atestaram, ao analisar a importância dos resíduos aromáticos para a função da toxina BmK M1, que Tyr5 é de extrema importância para a interação com o canal, sendo insubstituível, pois além de seu anel aromático, seu grupamento OH formaria pontes de hidrogênio com resíduos do C-terminal da molécula que seriam essenciais para a manutenção da estrutura local da face de interação. O ensaio de ALA-Scan demonstra que os anticorpos produzidos contra o diepitopo se ligam a este resíduo, explicando possivelmente o seu efeito neutralizante.

Quando coelhos foram usados como modelo para a imunização, verificou-se que o imunógeno composto pelo peptídeo descontínuo identificado falhou em induzir anticorpos neutralizantes contra o veneno de *T.serrulatus*. Analisando o soro produzido, viu-se que foram gerados anticorpos apenas contra a porção C-terminal. Esse fato ressaltou uma nítida importância do N-terminal para a neutralização completa da atividade tóxica do veneno. De fato, a análise de ALA-Scan para este soro demonstrou uma maior importância de Leu48 para a sua ligação. Este resíduo altamente conservado participa também da face ativa da molécula, no domínio nuclear, porém com importância reduzida (KARBAT ET AL., 2007).

Diferentes sistemas biológicos tendem a apresentar respostas imunológicas também diferentes. A variação dramática no perfil de anticorpos produzidos em camundongos e coelhos demonstra que as bases que determinam a imunogenicidade e os mecanismos envolvidos na resposta imune ainda não são bem compreendidos.

A investigação da utilização de peptídeos sintéticos para o desenvolvimento de soro terapêutico para o tratamento do envenenamento tem sido feita pelo nosso grupo. Outros peptídeos, derivados de sequências de neurotoxinas do veneno de *T.serrulatus* já foram utilizados, produzindo efeitos neutralizantes significativos

(ALVARENGA ET AL., 2002). Um protocolo utilizando uma combinação dos peptídeos previamente identificados com o epítipo descontínuo identificado neste trabalho, utilizando os adjuvantes apropriados, pode melhorar os resultados de neutralização obtidos até agora.

Outra “anatoxina” foi analisada neste trabalho, a Amm8. A sequência da Amm8 é bastante semelhante a da AaH2, o protótipo das toxinas do tipo α -clássicas e uma das mais potentes toxinas escorpiônicas. Entretanto, a alteração de alguns poucos resíduos torna a Amm8 totalmente inativa em mamíferos. Essa propriedade faz da Amm8 um candidato interessante para a produção de anticorpos para a soroterapia. De fato, esta proteína é capaz de induzir, em coelhos, anticorpos policlonais que apresentam reatividade cruzada com várias toxinas desse mesmo escorpião (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*) e são também capazes de neutralizar a toxina altamente letal AaH2, em ensaios utilizando camundongos. O mecanismo dessa neutralização é, entretanto, desconhecido.

Os anticorpos anti-Amm8 não foram capazes de reconhecer fragmentos contínuos da toxina, sintetizados em membrana de SPOT. Este foi um resultado inesperado, sendo um indício de que a Amm8 apresentaria epítopos do tipo descontínuo.

O mapeamento de epítopos descontínuos não é uma tarefa simples. Estratégias experimentais incluem a seleção de mimotopos a partir de bibliotecas de peptídeos (MELOEN ET AL., 2000), o uso de antígenos mutados ou quimicamente modificados (DALL’AQUA ET AL., 1998), e/ou a determinação da estrutura tridimensional do complexo antígeno-anticorpo (COHEN ET AL., 2005). Nos últimos anos, entretanto, várias metodologias de predição de epítopos descontínuos por bioinformática foram publicadas (ENSHALL-SEIFFERS ET AL., 2003), (HALPERIN ET AL., 2003), (SCHREIBER ET AL., 2005), (ANDERSEN ET AL., 2006), (MOREAU ET AL., 2006), (NEGI & BRAUN, 2009).

Recentemente, a equipe do Dr. Frank Molina, colaborador do nosso grupo, desenvolveu o algoritmo PEPOP, que utiliza a estrutura 3D do antígeno proteico para, primeiramente, predizer potenciais regiões epitópicas e depois propor uma série de

peptídeos que mimetizem esta região, como candidatos para a síntese e validação experimental do método (MOREAU ET AL., 2008).

Assim, após a conclusão de que o soro de coelho anti-Amm8 não era capaz de reconhecer epitopos lineares, utilizamos o algoritmo PEPOP para gerar um grupo de peptídeos “descontínuos-contínuos” que supostamente simulariam regiões descontínuas antigênicas da proteína. O termo “descontínuos-contínuos” foi utilizado para ressaltar o fato de que, apesar de mimetizar uma possível região descontínua, onde fragmentos da sequência original da proteína dispersos ao longo de sua cadeia polipeptídica foram selecionados e combinados, os peptídeos feitos por síntese química para mimetizar essa região apresentam sequência contínua.

Sete dos 24 peptídeos preditos foram capazes de se ligar aos anticorpos anti-Amm8, nas mesmas condições experimentais em que os peptídeos lineares se mostraram não antigênicos. Esta foi a primeira validação experimental da capacidade de PEPOP de desenhar peptídeos feitos a partir de segmentos que simulam regiões conformacionais da proteína, comportando-se funcionalmente como um epitopo descontínuo.

Mimetizar a superfície de uma proteína a partir de partes descontínuas da sequência proteica consiste em um grande desafio. Porém, tal abordagem é factível (REINEKE ET AL., 1999), uma vez que vários mimotopos identificados experimentalmente são considerados réplicas funcionais de epitopos descontínuos (MELOEN ET AL., 2000).

Apesar da maioria dos peptídeos desenhados por PEPOP para a Amm8 não ter sido reativa, alguns poucos se ligaram aos anticorpos anti-Amm8. A ligação observada possui caráter específico, uma vez que os peptídeos não apresentaram reatividade contra soro de coelho pré-imune ou contra o anticorpo secundário utilizado. Cálculos teóricos também excluíram a possibilidade de ligação inespecífica devido à hidrofobicidade da sequência. Entretanto, por terem sido utilizados anticorpos policlonais, não podemos excluir que a reatividade observada em alguns spots pode

ser devida a ligação de diferentes populações de anticorpos a diferentes segmentos de um único peptídeo.

A análise da localização dos segmentos que compõem os peptídeos contínuos-descontínuos antígenicamente ativos na estrutura 3D permitiu a identificação de 3 regiões que corresponderiam a regiões antigênicas descontínuas das α -toxinas clássicas de escorpião.

A região “A” compreende partes da α -hélice e das 3 folhas β pregueadas da toxina. A antigenicidade da α -hélice já foi previamente demonstrada, utilizando grandes peptídeos sintéticos (BAHRAOUI ET AL., 1987), (BAHRAOUI ET AL. 1986). Os resultados de PEPOP indicam que a α -hélice pode ser associada a segmentos das folhas β para constituir uma única região antigênica.

A região “B” foi definida com base na reatividade dos peptídeos contínuos-descontínuos compreendendo segmentos de uma região de loop que é notavelmente maior em toxinas do tipo α do que em toxinas do tipo β . Este loop está situado na lateral das α -toxinas, ligando as fitas 2 e 3 da folha- β . Sua antigenicidade na AaH2 já foi atestada experimentalmente (FOURQUET ET AL., 1988). Nossos resultados confirmam estas observações e indicam que essa região antigênica pode, de fato, ser mais complexa do que previsto anteriormente, porque vários segmentos da Amm8 (próximos no espaço, mas não na sequência), tanto da α -hélice quanto das fitas 1 e 2 da folha- β , podem ser reconhecidos por anticorpos que se ligam à região “B”.

A região “C”, definida neste estudo somente, é extremamente descontínua, e dificilmente teria sido mapeada utilizando peptídeos sequenciais. Ela é feita de segmentos da superfície hidrofóbica conservada das α -toxinas, incluindo três tirosinas pertencentes a cada uma das fitas da folha- β . A região “C” inclui as posições 10 e 58, que demonstraram ser importantes para a ligação do mAb 4C1 à AaH2 (BAHRAOUI ET AL., 1988).

Estas regiões propostas foram definidas a partir dos resultados até aqui obtidos, não sendo possível definir com extrema certeza os seus limites, feito que

somente seria alcançado através da estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo resolvida. Estas três regiões se sobrepõem, o que é consistente com a visão de que a superfície proteica seria um mosaico de epitopos sobrepostos.

Consideradas como um todo, as deduções feitas a partir da análise dos peptídeos contínuos-descontínuos são consistentes com a informação disponível a respeito das regiões antigênicas da AaH2 (GRANIER ET AL., 1989). Uma diferença importante, contudo, é a ausência de reatividade de segmentos da porção C-terminal da proteína. Esta parte das toxinas escorpiônicas foi previamente identificada como sendo antigênica: como exemplo, o epitopo descontínuo reconhecido por um monoclonal contra a toxina Cn2 inclui os resíduos 56-65, os dez últimos da sequência desta toxina (CALDERON-ARANDA ET AL., 1999); e um sítio antigênico da AaH2 foi mapeado aos resíduos (5–14) S–S (60–64) (EL AYEYB ET AL., 1984).

No momento, não é possível explicar porque os anticorpos anti-Amm8 não se ligam à porção C-terminal da proteína cognata. Isto pode ser devido a inabilidade de PEPOP em mimetizar acuradamente essa região da toxina em particular, ou ser causada pelas diferenças de sequência entre AaH2 e Amm8. Em particular, uma mudança de His para Asn e a adição de um Asp na última posição da Amm8 é notada (ALAMI & TYTGAT, 2003). Tais alterações podem interferir no reconhecimento por anticorpos da porção C-terminal da proteína. Variações de sequências no C-terminal tem forte impacto na organização estrutural desta parte das toxinas escorpiônicas e na forma do seu sítio ativo, (GUREVITZ ET AL., 2001), e por uma extrapolação pode-se dizer que o mesmo seria verdadeiro para sítios antigênicos. Entretanto, apesar de anticorpos anti-Amm8 não reconhecerem o C-terminal desta proteína, apresentam reatividade cruzada com peptídeos contínuos-descontínuos que incluem segmentos do C-terminal de AaH2 (pep20) (Fig 35 A).

Martin-Eauclaire, em 2006, demonstrou que anticorpos anti-Amm8, além de prevenir a associação da AaH2 marcada com receptores em sinaptossomas, também removeram ativamente a toxina já ligada. Ambas as propriedades podem ser responsáveis pela capacidade neutralizante de tais anticorpos.

As toxinas escorpiônicas do tipo α parecem interagir com seu sítio receptor em canais para sódio voltagem dependentes pelo domínio constante nuclear (resíduos 17, 18, 38, 44) e pelo domínio NC mais variável, composto por uma volta de 5 resíduos na porção N-terminal e um segmento do C-terminal (KAHN ET AL., 2009), .

O reconhecimento por anticorpos anti-Amm8 dos segmentos 3, 5, 10, 15, que se encontram nestas partes da AaH2, pode impedir a ligação da toxina ao seu receptor por impedimento estérico. A propriedade notável desses anticorpos de desligar a AaH2 já ligada ao seu sítio também pode ser explicada através destes resultados. Na verdade, sete dos peptídeos contínuos-descontínuos da AaH2 que se ligam aos anticorpos anti-Amm8 , 6 possuem segmentos em comum com a região da α -hélice. Este elemento secundário das α -toxinas aparenta não estar envolvido no reconhecimento do receptor, estando acessível à ligação de anticorpos mesmo quando a toxina se encontra ligada (EL AYEYB ET AL., 1986), (BAHRAOUI ET AL., 1987).

Diante de tais resultados, onde a maioria dos epítopos contínuos-descontínuos de AaH2 incluem a α -hélice, poderíamos inferir que estes anticorpos estariam envolvidos no reconhecimento de moléculas ligadas de toxina e seriam capazes de retirá-las do seu receptor no canal para sódio. Entretanto, não foi possível demonstrar que três dos peptídeos da AaH2 que foram mapeados estão associados a epítopos neutralizantes. Apenas um dos peptídeos (pep12) foi capaz de induzir resposta contra a toxina inteira em camundongos, quando conjugado ao KLH.

Estes resultados demonstraram que é possível desenhar peptídeos reativos antígenoicamente a partir de porções descontínuas de uma toxina escorpiônica. A posição dos segmentos no contexto tridimensional aponta algumas propriedades antigênicas da Amm8 e auxilia na explicação da capacidade de anticorpos anti-Amm8 neutralizarem a potente toxina AaH2. Contudo, mais estudos são necessários para definir sem ambiguidades como estes anticorpos exerceriam essa função neutralizante.

Já é sabido há algum tempo que o anticorpo monoclonal altamente neutralizante mAb 4C1 se liga a um epitopo do tipo descontínuo na superfície da toxina AaH2, uma vez que ele não é capaz de se ligar a peptídeos lineares derivados da sequência da AaH2. Este fato foi corroborado mais uma vez pelo resultado completamente negativo do ensaio de SPOT, utilizando o mAb 4C1 e uma membrana contendo peptídeos lineares sobrepostos derivados da sequência da AaH2 (figura 40).

O epitopo exato deste anticorpo ainda não é definido. O alto poder neutralizante da atividade tóxica da AaH2 por este mAb desperta o interesse em elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a neutralização aconteceria.

A ferramenta de bioinformática PEPOP foi novamente utilizada para desenhar novos peptídeos a partir da estrutura resolvida da AaH2. Esta nova predição foi feita para se valer de novas metodologias para o desenho de peptídeos, que foram adicionadas posteriormente ao algoritmo. Dessa forma, 116 diferentes sequências foram produzidas, um universo bem maior do que os 24 preditos anteriormente.

Em imunoenensaio de SPOT com os peptídeos da nova predição, o mAb 4C1 reagiu com um único peptídeo de sequência PYGNAAWQAAY. A sequência deste peptídeo é composta por três partes descontínuas da AaH2: PYGN (41-44), QWA (37-39) e Y (35). O peptídeo foi composto ainda por espaçadores de Alanina entre os segmentos, com 1 alanina adicionada entre o primeiro e segundo segmento e 2 alaninas entre o segundo e o terceiro segmento. Além disso, o segmento QWA aparece na sua forma invertida AWQ.

A reação do mAb 4C1 com o peptídeo demonstrou ser específica, uma vez que o resultado foi reprodutível em dois diferentes sistemas de revelação colorimétricos. Diversos controles foram feitos, sendo a membrana testada com diferentes anticorpos e o mAb 4C1 testado com outras membranas. Em todos os casos, não foi possível detectar nenhum outro spot reativo, sendo mais um indício da especificidade da interação detectada.

A interação observada entre o par estudado demonstrou ser altamente dependente de uma conformação específica. Os espaçadores de alanina inseridos entre os segmentos 2 e 3 parecem ser fundamentais para que a interação ocorra, uma vez que a reação com o mAb é completa ou significativamente reduzida quando estes são retirados ou alterados para resíduos de glicina. A orientação invertida do segmento QWA também se mostrou importante para a ligação do mAb 4C1. Assim, a distribuição espacial e a orientação correta dos resíduos são indispensáveis para que a interação seja observada.

O resíduo de triptofano (W) parece ter papel importante para a ligação de mAb 4C1 ao peptídeo identificado. Este resíduo já foi descrito como participante da interação da AaH2 com canais para sódio, em sinaptossomas de cérebro de rato e se encontra bastante conservado nas α -toxinas de escorpião (KHARRAT ET AL., 1989). Na sequência da AaH2, este W se localiza na posição 38. A presença de um resíduo aromático nesta posição é conservada em todas as α -toxinas já descritas, sejam elas clássicas, α -like ou inseto-toxinas. Este resíduo faz parte do chamado domínio nuclear (“core domain”), do qual também participa a asparagina (N) que compõe este peptídeo (KAHN ET AL., 2009). Este domínio define uma região hidrofóbica conservada das α -toxinas. Segundo modelo proposto por Karbat, em 2004, este domínio nuclear interagiria com uma porção também conservada no canal para sódio, sendo responsável pela alteração no seu funcionamento, fenômeno previamente já observado por (SUN ET AL., 2003). O fato de dois aminoácidos componentes desta região possivelmente integrarem o epitopo do mAb 4C1 explicaria o seu alto poder de neutralização.

A modificação do resíduo de glutamina (Q) também se mostrou importante para a interação do mAb 4C1. Não foi ainda descrito um papel funcional para este resíduo na literatura. Os demais resíduos toleraram a alteração para alanina sem que a ligação com o monoclonal fosse significativamente alterada. Segundo Pal et al., 2007, a interface de interação entre duas proteínas seria dividida em resíduos pertencentes ao centro e à margem, sendo que os primeiros seriam mais importantes para a ligação,

contribuindo com a maior parte da energia livre envolvida. Estes resíduos seriam mais conservados e menos tolerantes a mutações. Já os resíduos da margem, que serviriam como suporte estrutural para os resíduos do centro, seriam mais susceptíveis a mutações, tolerando a mudança de aminoácidos sem que a interação com o alvo seja perdida. Esta hipótese explica o padrão de reatividade observado no ensaio de ALA-Scan.

A ligação entre mAb 4C1 e a AaH2 já foi estudada no passado. No trabalho em que este monoclonal foi produzido, em 1988, Bahraoui e colaboradores produziram um grupo de toxinas quimicamente modificadas para estudar o comportamento da interação antígeno-anticorpo em ensaios de competição. A região inicialmente definida como o alvo do mAb 4C1 estaria localizada no C-terminal da toxina, com papel importante da K58, cuja modificação por biotinylação inibiu quase completamente a ligação do mAb 4C1. A acetilação da função amina e carboximetilação de H54 e H64 também inibiram a ligação, porém com menor eficiência.

O peptídeo identificado neste trabalho como possível epítipo do mAb 4C1 não contém nenhum dos resíduos que foram previamente identificados na AaH2, e peptídeos preditos que contém tais resíduos não se mostraram reativos. Bahraoui propôs apenas um pequeno número de resíduos possivelmente epitópicos em seu trabalho, uma vez que poucos derivados modificados da AaH2 foram testados. Assim, o mapeamento feito pode ter sido incompleto, com outros resíduos importantes tendo escapado sua identificação na época. Não se pode descartar também a possibilidade de que as modificações químicas feitas para esse mapeamento prévio tenham provocado alterações conformacionais globais da molécula que alterariam alostericamente o sítio de ligação com o anticorpo. O trabalho presente demonstra que a ligação de mAb 4C1 é, de fato, bastante sensível a conformação.

Por outro lado, o peptídeo identificado pode ser uma representação incompleta do verdadeiro epítipo do mAb 4C1. Conforme verificado por Meloen et al., em 2000, pequenos peptídeos que se ligam a anticorpos (mimotopos) podem representar apenas partes de uma região de interação maior. A sequência do peptídeo

poderia então não estar diretamente relacionada ao epitopo real de mAb 4C1, mas teria o potencial de se dobrar em configuração similar, com distribuição de cargas semelhante, explicando então a interação observada.

Os imunoenaios que ocorrem com um dos membros do par antígeno-anticorpo em fase sólida, como os peptídeos imobilizados na membrana de SPOT neste caso, devem ser analisados com cautela. Alterações na cinética de ligação, com a dissociação do complexo se dando de forma mais lenta, e alterações na concentração relativa da fase solúvel ao redor da espécie imobilizada podem produzir artefatos experimentais (NYGREN & STENBERG, 1989). Além disso, os imunoenaios utilizados na predição de epitopos de células B apresentam outras restrições, principalmente no que diz respeito a diferenças físico-químicas importantes entre as variantes da molécula utilizada no imunoenasão e seu derivado nativo. Um peptídeo que represente uma porção da proteína, utilizado fora do contexto nativo da mesma, pode não representar bem a sua condição real. Desta maneira, validação experimental extensiva da predição de epitopos deve ser feita antes que se possa fazer qualquer afirmativa acerca da identificação do mesmo (CAOILI, 2010).

Tendo em vista a validação dos resultados obtidos, o peptídeo identificado por imunoenasão foi sintetizado na sua forma solúvel, visando dois tipos de abordagem: a utilização do peptídeo em ensaios de competição com a toxina AaH2 nativa pelo sítio do mAb 4C1; e a imunização de camundongos utilizando o peptídeo como imunógeno, para geração anticorpos que poderiam competir com o mAb.

Quando utilizado em ELISA de competição, peptídeo sintético não foi capaz de competir satisfatoriamente com a toxina pelo sítio de mAb 4C1. Também não foi possível detectar por ELISA a ligação do anticorpo com o peptídeo, seja ele ligado na placa sozinho ou conjugado via glutaraldeído à ovalbumina.

É importante ressaltar, contudo, que o peptídeo sintético se mostrou insolúvel em água, o que pode ter interferido nos ensaios. A adição de DMSO a 10% e TFA a 1% melhorou um pouco a solubilidade, mas uma grande quantidade de precipitado ainda

permaneceu em suspensão. A síntese do peptídeo foi repetida, visando eliminar quaisquer problemas que poderiam eventualmente ter ocorridos em virtude da preparação do mesmo, porém o problema persistiu. O caráter altamente hidrofóbico do peptídeo, calculado pelo método de Hopp & Woods, pode ser responsável pela sua insolubilidade observada.

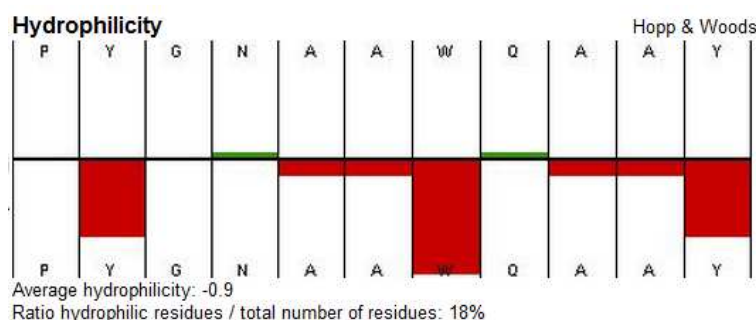


Figura 58: Gráfico da hidrofilicidade, segundo Hopp & Woods, do peptídeo descontínuo identificado através de PEPOP para a AaH2.

A imunização de camundongos com o peptídeo conjugado ao KLH, não foi capaz de gerar resposta específica. A solubilidade do peptídeo pode ter interferido no processo de conjugação, não produzindo um imunógeno de qualidade. Nova imunização, desta vez utilizando o peptídeo encapsulado em lipossomas, foi realizada. Porém, novamente, não foram obtidos anticorpos reativos, atestando a falta de imunogenicidade do peptídeo identificado.

Devido a estas limitações experimentais, os resultados obtidos no mapeamento ainda não puderam ser propriamente validados. Entretanto, como resultados verdadeiramente negativos também não foram obtidos, uma vez que a solubilidade do peptídeo pode ter interferido nos ensaios, não é possível também descartar a identificação feita a partir da predição de PEPOP.

Adaptações técnicas para lidar com peptídeos de caráter hidrofóbico estão sendo estudadas para que este estudo possa ser concluído (KETELSEN ET AL., 2008), (NOJIMA ET AL., 2005).

Com o objetivo de estudar o veneno do escorpião de maior importância médica para o Brasil, foi feita a predição de possíveis epitopos descontínuos para a toxina Ts3 do veneno de *Tityus serrulatus*. Esta toxina foi escolhida por se tratar da principal responsável pela letalidade do veneno e também por se tratar de uma toxina do tipo α -clássica, pertencendo a mesma classe da AaH2, que permitiria uma comparação mais aproximada com os demais resultados obtidos nesta tese.

A membrana contendo os 260 peptídeos selecionados sintetizados foi inicialmente testada com soro de coelho anti-veneno total de *T.serrulatus*. Apesar de ter sido possível a diferenciação de SPOTs claramente reativos, a reação observada não foi muito forte. Possivelmente, apenas uma pequena porcentagem das imunoglobulinas presentes no soro testado seria dirigida contra a Ts3. De fato, esta toxina representa menos de 1% do conteúdo do veneno total, sendo, portanto, subrepresentada no imunógeno que deu origem ao soro testado.

De maneira interessante, todos os peptídeos reativos com o soro anti-veneno total de *Ts* apresentaram composição semelhante, contendo o segmento YWVHI e pelo menos mais duas tirosinas (Y). Este segmento corresponde à região previamente mapeada na Amm8 e em ambas as predições para a AaH2, sendo o W presente neste segmento homólogo ao W mapeado nas demais proteínas, membro do já discutido domínio nuclear (“core domain”). Este domínio também conta com tirosinas (FONTECILLA-CAMPS ET AL., 1988) e estas também teriam importante papel tanto na atividade tóxica das α -toxinas quanto na estabilização do sítio de interação (SUN ET AL., 2003). Pela presença de vários componentes do domínio nuclear, os peptídeos reativos podem representar mimotopos desta região, explicando assim a propriedade neutralizante do soro utilizado.

A diversidade de combinações reativas desses segmentos observadas no mapeamento possivelmente se deve a utilização de soro policlonal, que além de conter imunoglobulinas de especificidades variadas, foi produzido contra uma mistura de proteínas, aumentando ainda mais esta potencial variabilidade. Na tentativa de

refinar o resultado obtivo, visando obter uma reatividade mais intensa e específica, foi produzido soro específico contra a Ts3.

Por se tratar de antígeno extremamente tóxico e presente em baixas concentrações no veneno, foram utilizadas pequenas quantidades da Ts3 emulsionadas em adjuvante de Freund para imunizar um grupo de apenas 4 camundongos. Este protocolo de imunização foi capaz de levar a produção de anticorpos específicos e com capacidade neutralizante, conforme assegurado pelo ensaio de proteção *in vitro*.

O imunoensaios de SPOT utilizando os anticorpos anti-Ts3 revelou uma reatividade mais intensa e mais ampla. Analisando-se os SPOTs reativos, foi possível detectar a presença dos mesmos segmentos identificados como reativos com o soro anti-veneno total de *T.serrulatus*, porém o segmento WNYDN esteve também presente, principalmente nos spots onde se observou reação mais intensa. Todos os spots que apresentaram a combinação destes dois segmentos se mostraram reativos.

Ao ser localizado no modelo da estrutura 3D da Ts3, o segmento WNYDN mostrou estar localizado no loop que liga a 1ª fita- β à α -hélice. Essa região se sobrepõe a região da arginina (R) 18, presente nas demais α -toxina e também membro do já discutido domínio nuclear (KAHN ET AL., 2009). Entretanto, R18 está ausente na estrutura da Ts3, tendo sido provavelmente substituída ao longo da evolução por uma asparagina (N), encontrada na sequência deste segmento.

Uma fenilalanina (F) também é encontrada na posição 17 de toxinas escorpiônicas do tipo α -like e α -inseto, sendo mais um membro da superfície hidrofóbica conservada. Na Ts3, essa posição se encontra preenchida por um W, que assim como F também é um resíduo aromático (GORDON & GUREVITZ, 2003). A AaH2 e outras toxinas do tipo α -clássica não apresentam esta posição preenchida por um resíduo aromático, mas sim por uma glicina (G). Esta variação de resíduos na Ts3 pode ser explicada pelo fato desta ser uma toxina filogeneticamente mais distante e que evoluiu isoladamente dos demais membros da família α -clássica, uma vez que trata-se

de uma das poucas toxinas do tipo α presentes em escorpiões do chamado “Novo Mundo”.

Desta maneira, ambos os segmentos identificados utilizando anticorpos específicos contra a Ts3 pertenceriam ao domínio nuclear. A ligação de anticorpos a este domínio preveniriam a interação da toxina com o canal para sódio, explicando seu potencial neutralizante observado.

Em um estudo prévio conduzido pela equipe do Dr. Kalapothakis, uma forma recombinante da Ts3 (Ts3rec) foi produzida e utilizada para imunizar coelhos (dados não publicados). A espécie produzida se mostrou desprovida de toxicidade e o ensaio de neutralização do veneno utilizando o soro anti-Ts3rec não apresentou resultados satisfatórios, sugerindo que a Ts3 recombinante não adquiriu sua conformação tridimensional correta.

Para verificar tais possibilidades, uma amostra do soro anti-Ts3rec foi gentilmente cedida e esta foi testada com a membrana contendo os peptídeos contínuos-descontínuos preditos por PEPOP para a Ts3. De fato, a reatividade observada foi bem mais estrita do que a obtida com os anticorpos anti-Ts3 na sua forma nativa, reagindo apenas com sequências lineares.

Os três soros testados com os peptídeos derivados da estrutura da Ts3 foram também testados com peptídeos lineares sobrepostos derivados da sequência da Ts3. Corroborando a hipótese levantada, o soro anti-Ts3rec reconheceu bem mais intensamente os peptídeos lineares derivados da sequência da Ts3, sendo mapeadas três regiões importantes: o N-terminal (1-18), uma região central (15-33), e uma C-terminal (45-57). Apesar dos anticorpos anti-Ts3rec reconhecerem peptídeos que compreendem regiões importantes para a toxicidade da Ts3, eles não apresentam propriedades neutralizantes. Uma possibilidade para explicar tal fato é que os resíduos importantes para a interação com os anticorpos anti-Ts3rec não se encontrariam disponíveis para a ligação na conformação nativa da Ts3, sendo possivelmente mascarados no enovelamento da toxina.

Tanto o soro anti-veneno total de *T.serrulatus* quanto o soro anti-Ts3 nativa não reconheceram fortemente nenhuma região linear da proteína. Uma leve reatividade foi observada com peptídeos que continham os segmentos detectados no mapeamento de epitopos descontínuos. Esta reação fraca demonstra que a simples presença de tais fragmentos não é suficiente para estabelecer uma interação forte com os anticorpos, havendo a necessidade da presença de outros segmentos para que uma ligação efetiva ocorra, o que reforça o caráter descontínuo do possível epitopo destes anticorpos.

Estes resultados apresentados para a Ts3 ainda são preliminares, mas se mostram coerentes com a literatura e os demais resultados obtidos ao longo desta tese. A síntese de um peptídeo solúvel cuja sequência conteria os elementos aqui identificados pode ser uma abordagem para esta validação, mas deve ser analisada com cuidado antes de ser lavada a cabo. Muitas sequências reativas foram identificadas e não é evidente qual organização dos resíduos poderia produzir resultado mais satisfatório. É necessária uma análise cuidadosa dos segmentos componentes das sequências, da orientação dos segmentos, e identidade e quantidade dos espaçadores utilizados, não só dos peptídeos mais reativos, mas também dos peptídeos negativos, para que se possa obter o melhor arranjo a ser utilizado nesses ensaios subsequentes de validação. A observação de parâmetros físico-químicos, como a hidrofobicidade, também pode ser importante, para evitar a síntese de peptídeos insolúveis, inapropriados para os ensaios comumente utilizados neste tipo de pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme exposto ao longo da discussão, é bem aceito pela comunidade de toxinologistas que a superfície bioativa das α -toxinas em geral seria formada por dois domínios (WANG ET AL. 2003), (KARBAT ET AL. 2004), (KARBAT ET AL. 2007), (KAHN ET AL. 2009) (GORDON ET AL. 2007): o domínio nuclear (“core domain”), composto por resíduos localizados nos loops que interconectam os elementos secundários da estrutura; e o domínio NC, formado por resíduos no N-terminal e a cauda C-terminal. Apesar de esta organização ser conservada entre as toxinas desta família, variações sutis na face de interação com os seus receptores no canal produziram diferenças importantes na sua função e seletividade (GORDON AND GUREVITZ, 2003), (GORDON ET AL. 2007). Estes resíduos com papel seletor evoluíram sob pressão seletiva positiva, potencialmente expandindo a variedade de espécies susceptíveis a toxicidade destas moléculas, contribuindo para a adaptação dos escorpiões (TIAN ET AL., 2008). Resíduos cuja substituição levaria a um aumento da toxicidade também teriam evoluído desta maneira.

À luz deste conhecimento foi possível analisar os resultados obtidos nesta tese, detectando um padrão comum: os epitopos conformacionais mapeados para anticorpos neutralizantes das α -toxinas se relacionam com a superfície bioativa determinada para esta família. Se esta correlação observada for realmente estabelecida, os epitopos descontínuos seriam de fato atores principais nos eventos de neutralização da atividade tóxica dessas moléculas.

	Epitopo Descontínuo Identificado	
TsNTxP	GREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPA...CYCYGLPDSVKIWTSETNKCG	
Amm8	LKDGYIVNDINCTYFCGR..NAYCNELCIKLKGESGYCOWASPYGNSCYCYKLPDHSVTKGPG..RCND	amm8
AaH2	VKDGYIVDDVNCYFCGR..NAYCNEECIKLKGESGYCOWASPYGNACYCYKLPDHSVTKGPGR..CHGR	aah2
Ts3	KKDGYPVEYDNCA YICWNYDNAYCDKLCDDKADSGYCYWVHIL...CYCYGLPDPSEPTKTNGK..CKSGKK	

Figura 59: Alinhamento das sequências das toxinas estudadas e dos epitopos descontínuos identificados. O alinhamento foi feito com base na posição das cisteínas. Os epitopos descontínuos identificados em cada trabalho estão destacados em vermelho. Em cinza, estão ressaltados os resíduos importantes para a superfície bioativa e que estiveram presentes na maioria dos epitopos.

Como o mapeamento deste tipo de epitopo é uma tarefa complexa, a metodologia combinada entre predição *in silico* e validação experimental é um caminho a ser seguido, uma vez que esta abordagem se mostrou relativamente simples e eficaz na tarefa em que se propôs. Obviamente, muito ainda deve e pode ser aperfeiçoado nesta técnica, que ainda é recente.

Utilizando o próprio programa PEPPOP, é possível refinar a predição, selecionando regiões específicas da molécula que se deseja estudar. É também possível selecionar uma metodologia específica preferencial a ser utilizada para o desenho de peptídeos e também o tamanho destes. As informações preliminares obtidas neste trabalho servirão de orientação para a melhor utilização da ferramenta, de acordo com os objetivos desejados.

No caso específico do escorpião *T.serrulatus*, um estudo semelhante a este, porém direcionado a caracterização de epitopos descontínuos em toxinas do tipo β seria extremamente importante, uma vez que estas coexistem com a toxina α aqui estudada no veneno deste escorpião e , apesar de menos tóxicas, estão representadas em maior abundância.

Na medida em que novos conhecimentos acerca da imunquímica das toxinas escorpiônicas vão sendo produzidos, estudos translacionais que transportem estes dados teóricos para uma aplicação direta na produção do antiveneno e no tratamento dos casos de envenenamento são de extrema importância. Assim, os esforços científicos empregados seriam justificados e traduzidos em uma melhoria real do problema motivador destes estudos: a melhoria na produção dos antivenenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abroug F, Elatrous, S., Nouria, S., Haguiga, H., Touzi, N.,Bouchoucha, S. (1999). Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 354, 906-909.
- Adiguzel S., Ozkan O., & Inceoglu B. (2007). Epidemiological and clinical characteristics of scorpionism in children in Sanliurfa , Turkey. *Toxicon*, 49, 875-880.
- Alami M, Céard B, Legros C, Bougis P E, & Martin-Eauclaire, M.-F. (2006). Genomic characterisation of the toxin Amm VIII from the scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Toxicon*, 47(5), 531-6.
- Alami M, Vacher H, Bosmans F, Devaux C, Rosso J P, Bougis, PE, Tytgat J, Darbon H, Martin-Eauclaire, M-F (2003). Characterization of Amm VIII from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* : a new scorpion toxin that discriminates between neuronal and skeletal sodium channels. *Biochem J*, 560, 551-560.
- Almeida FM, Pimenta AMC, Figueiredo SGD, Santoro MM, Martin-Eauclaire MF, Diniz C R. (2002). Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*, 40, 1041-1045.
- Alvarenga LM, Diniz CR, Granier C, & Chavez-Olortegui C. (2002). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*, 40, 89-95.
- Alvarenga LM, Machado de Ávila RA, Amin PR, Martins MS, Kalapothakis E, de Lima ME, Santos RG, Granier C, Chávez-Olórtegui C. (2005) Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 46, 664-671.
- Alvez RS, Nascimento NRF, Barbosa PSF, Kerntopf MR, Lessa LMA, Sousa CM, Martins RD, Sousa DF, Queiroz MGR, Toyama MH, Fonteles MC, Martins AMC, Monteiro HSA. (2005). Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*; 46: 271-276.
- Amaral CFS, & Rezende NA. (2000). Letter to the Editor: Treatment of scorpion envenoming should include both a potent specific antivenom and support of vital functions. *Toxicon*, 38, 1995-1997.
- Amorim AM, Carvalho FM, Lira-da-Silva RM, & Brazil TK. (2003). Acidentes por escorpião em uma área do Nordeste de Amaralina , Salvador , Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), 51-56.
- Andersen HP, Nielsen MB,Lund O. (2006). Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci*; 15:2558–67.

- Andrade MV, Lisboa FA, Portugal AL, Arantes RM, Cunha-Melo JR. (2007). Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*;146:581-7
- Arnon R, & Van Regenmortel M. (1992). Structural basis and design of new vaccines. *The FASEB Journal*, 6, 3265-3274.
- Bahloul M, Rekik N, Chabchoub I, Chaari A, Ksibi H, Kallel H, Damak H, Chaari A, Hamida CB, Chelly H, Bouaziz M. (2005). Neurological complications secondary to severe scorpion envenomation. *Med Sci Monit*; 11: 196-202.
- Bahraoui E, Pichon J, Muller, JM, Darbon H, El Ayeb M, Granier C, Marvaldi J& Rochat H. (1988). Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterisation and molecular mechanisms of neutralization, *J. Immunol.* 141, 214-220.
- Bahraoui E, El Ayeb M, Granier C, Rochat H. (1987). Immunochimistry of scorpion toxins. Immunogenicity of peptide 19–28 a model of an accessible and relatively rigid region. *Eur J Biochem*;167(2):371–5.
- Bahraoui E, El Ayeb M, Granier C, Van Rietschoten J, Rochat H. (1987). Antigenicity of peptide 19–28 of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* as measured by different solid-phase tests and characterization of specific antibodies purified by immunoaffinity on the peptide or the toxin. *Toxicon*;25(9):957–64.
- Bahraoui EM, Granier C, VanRietschoten J, Rochat H, ElAyeb M.(1986).Specificity and neutralizing capacity ofantibodies elicited bya synthetic peptide of scorpion toxin. *J Immunol.* May 1;136(9):3371-7.
- Bahraoui E, El Ayeb M, Van Rietschoten J, Rochat H, Granier C. (1986). Immunochimistry of scorpion alpha-toxins: study with synthetic peptides of the antigenicity of four regions of toxin II of *Androctonus australis* Hector. *Mol Immunol*; 23(4):357–66.
- Barona J, Batista CVF, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Wanke E, Otero R. (2006). Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺ channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1764, 76 - 84.
- Barrio A, Vital-Brazil G. Ein neues Verfahren der Giften Nahme ber Spinnen.(1949) *Experientia* 6:112-113.
- Batista CVF, Román-González SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F & Possani LD. (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus* : Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *.Journal of Chromatography B*, 803 55–66

- Batori V, Friis EP, Nielsen H, Roggen EL.(2006). An in silico method using an epitope motif database for predicting the location of antigenic determinants on proteins in a structural context. *J Mol Recognit.* Jan-Feb;19(1):21-9
- Bawaskar HS. (2005). Management of severe scorpion sting at rural settings: what is the role for scorpion antivenom? *Journal of Venomous Animals toxins including Tropical Diseases*, (11), 3-7.
- Bawaskar HS & Bawaskar PH. (2011). Efficacy and safety of scorpion antivenom plus prazosin compared with prazosin alone for venomous scorpion (*Mesobuthus tamulus*) sting: randomised open label clinical trial. *BMJ*, 341
- Becerril B, Marangoni S, Possani LD.(1997). Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*; 35: 821-835
- Borges A, Garcia CC, Lugo E, Alfonzo MJM, Jowers MJ, & Camp H J M .(2006). Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (*Scorpiones* , *Buthidae*): Molecular , immunological , and mass spectral analyses B. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142, 240 - 252.
- Borges A, Rojas-Runjaic FJM, Diez N, Faks JG & De Sousa L. (2010). Envenomation by the Scorpion *Tityus breweri* in the Guayana Shield , Venezuela : Report of a Case , Efficacy and Reactivity of Antivenom , and Proposal for a Toxinological Partitioning of the Venezuelan. *WEM*, 21(4), 282-290. Elsevier Inc.
- Borges A, Sousa LD, Espinoza J & Santos RG. (2008). Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms *Toxicon*. Jan;51(1):66-79
- Bosmans F, Martin-Eauclaire MF & Tytgat J. (2007). Differential effects of five “classical” scorpion beta-toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. *Toxicology and applied pharmacology*, 218(1), 45-51.
- Bosmans F & Tytgat J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon*, 49(2), 142-58.
- Bougis PE, Rochat H & Smith LA (1989). Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *The Journal of biological chemistry*, 264(32), 19259-65.
- Boyer L, Alagon A & Theodorou A. (2009). Antivenom for Children with Neurotoxicity from Scorpion Stings. *New England Journal*, 361(6), 632.

- Brody J, Kohrt H, Marabelle A, Levy R.(2011). Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results. *J Clin Oncol*.May 10;29(14):1864-75.
- Brown N & Landon J. (2010). Antivenom: the most cost-effective treatment in the world? *Toxicon*, 55(7), 1405-7.
- Burgoyne NJ, Jackson RM. (2006). Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein–protein and protein–ligand interfaces. *Bioinformatics*; 22(11):1335–42.
- Calderon-Aranda ES, Selisko B, York EJ, Gurrola GB, Stewart JM & Possani LD. (1999). Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius* , using discontinuous synthetic peptides. *European journal of biochemistry / FEBS*, 264, 746-755.
- Calderon-Aranda ES, Olamendi-Portugal T, Possani LD. (1995). The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine*; 13:1198-206.
- Campos F V & Beirão PSL. (2006). Effects of bound ts3 on voltage dependence of sodium channel transitions to and from inactivation and energetics of its unbinding. *Cell biochemistry and biophysics*, 44(3), 424-30.
- Campos FV, Chanda B, Beirão PSL & Bezanilla F. (2008). Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. *The Journal of general physiology*, 132(2), 251-63.
- Campos FV, Coronas FIV & Beirão PSL. (2004). Voltage-dependent displacement of the scorpion toxin Ts3 from sodium channels and its implication on the control of inactivation. *British journal of pharmacology*, 142(7), 1115-22.
- Caoili SEC. (2010). Benchmarking B-cell epitope prediction for the design of peptide-based vaccines: problems and prospects. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 910524.
- Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K & Scheuer T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124-41.
- Chakrabarti P, Janin J. (2002). Dissecting protein–protein recognition sites. *Proteins* 47(3):334–43.
- Chavez-Olortegui C, Amara DA, Rochat H, Diniz C, Granier C. (1991).In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*. Dec;9(12):907
-

- Chavez-Olortegui C, Kalapothakis E, Ferreira AMBM, Ferreira AP, & Diniz CR. (1997). Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 35 (2), 213-221.
- Chavez-Olortegui C, Molina F & Granier . (2001). Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with α and β toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Molecular Immunology*, 38, 867-876.
- Chippaux JP & Goyffon M. (2007). Epidemiology of scorpionismo: A global appraisal. *Acta Tropica*, 107(2), 71-79.
- Chippaux JP. (2009). Incidence mondiale et prise en charge des envenimations ophidiennes et scorpioniques. *Med Sci (Paris)*, 197-200.
- Chippaux JP. (2009). Rôle de l' environnement sur l' incidence et la sévérité des envenimations, *Med Sci (Paris)*25, 858-862.
- Chippaux JP, Stock RP & Massougbodji A. (2010). Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation. *Toxicon*, (March), 1-18. EChippaux JP.(2010). Emergency immunotherapy: snake and scorpion antivenoms. *Biol Aujourd'hui*. 2010;204(1):61-70.
- Clemente GT, Teixeira MM, Freire-Maia L, Rossoni RB.(2002). Mechanisms underlying the structural alterations of the rat submandibular gland induced by *Tityus serrulatus* Tityustoxin. *Toxicon*, 40(6), 731-738.
- Clot-Faybesse O, Juin M, Roche H & Devaux C. (1999). Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* hector scorpion neurotoxin I : characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Letters*, 458, 313-318.
- Cohen L, Lipstein N & Gordon D. (2006). Allosteric interactions between scorpion toxin receptor sites on voltage-gated Na channels imply a novel role for weakly active components in arthropod venom. *The FASEB journal* 20(11), 1933-5.
- Cohen GH, Silverton EW, Padlan EA, Dyda F, Wibbenmeyer JA, Willson RC. (2005). Water molecules in the antibody-antigen interface of the structure of the Fab HyHEL-5-lysozyme complex at 1.7 Å resolution: comparison with results from isothermal titration calorimetry. *Acta CrystallogrD: Biol Crystallogr*;61(Pt 5):628-33.
- Cohen L, Karbat I, Gilles N, Froy O, Corzo G, Angelovici R. (2004). Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative "hot spot" common to all scorpion beta-toxins affecting Na⁺ channels. *J Biol Chem*; 279(9):8206-11.

- Cologna CT, Marcussi S, Giglio JR, Soares AM & Arantes EC. (2009). Tityus serrulatus Scorpion Venom and Toxins : An Overview. *Protein & Peptide letters*, 920-932.
- Corona M, Zurita M, Possani LD, Becerril B. (1996) Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Toxicon Feb*;34(2):251-6.
- Coronas FIV & Possani LD. (2007). Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, 1-10.
- Cortese R, Felici F, Galfre G, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A.(1994). Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends Biotechnol. Jul*;12(7):262-7
- Coutinho-Netto, J. (1975). Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina. Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto.
- Dall'Acqua W, Goldman ER, Lin W, Teng C, Tsuchiya D, Li H, Ysern X, Braden BC, Li Y, Smith-Gill SJ & Mariuzza RA. (1998). A Mutational Analysis of Binding Interactions in an Antigen-Antibody Protein-Protein Complex. *Biochemistry*, 37, 7981-7991.
- Da Silveira RB, Chaim OM, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. (2007). Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon. May*;49(6):758-68
- De Lima ME, Martim-Eauclaire MF, Chavez-Olortegui C, Diniz CR, Granier C,. (1993). Tityus serrulatus scorpion venom toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. *Toxicon* 31:223-227
- De Lima ME, Martin MF, Diniz CR, Rochat H.(1986). Tityus serrulatus toxin VII bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect toxin from scorpion venoms. *Biochem Biophys Res Commun. Aug* 29;139(1):296-302
- De Matos IM, Talvani A, Rocha OOA, Freire-Maia L, Teixeira MM.(2001). Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by Tityus serrulatus venom in rats. *Toxicon*; 39: 863-867.
- Devaux C, Clot-Faybesse O, Juin M, Mabrouk K, Sabatier JM & Rochat H. (1997). Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Letters*, 412, 456-460.
- Devaux C, Fourquet P & Granier C. (1996). A conserved sequence region of scorpion toxins rendered immunogenic induces broadly cross-reactive , neutralizing antibodies. *European journal of biochemistry / FEBS*, 242, 727-735.

- Devaux C, Juin M, Mansuelle P, Granier C. (1993). Fine molecular analysis of the antigenicity of the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin II: a new antigenic epitope disclosed by the Pepscan method. *Mol Immunol.* Aug;30(12):1061-8.
- Diniz CR.(1978). Chemical and pharmacological aspects of Tityinae venom. *Arthropod Venoms.* Bettini (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. pp 379-394.
- Do Carmo AO. (2011). Expressão Heteróloga e Purificação da Tityustoxina: Obtenção da proteína recombinante Ts3 do escorpião *Tityus serrulatus*, Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Durauer A, Kopecky E, Berger E, Seifert M, Hahn R & Jungbauer A. (2006). Evaluation of a sensitive detection method for peptide arrays prepared by SPOT synthesis. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 66(1-3), 45-57.
- Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ.(1969). The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molecule. *J Immunol.* 2004 Nov 1;173(9):5335-42.
- El Ayeb M, Bahraoui EM, Granier C, Rochat H. (1986). Use of antibodies specific to defined regions of scorpion alpha-toxin to study its interaction with its receptor site on the sodium channel. *Biochemistry.* Oct 21;25(21):6671-8.
- El Ayeb M, Bahraoui EM, Granier C, Delori P, Van Rietschoten J, Rochat H.(1984). Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: purification and characterization of two functionally independent IgG populations raised against toxin II of *Androctonus australis Hector*. *Mol Immunol*; 21(3):223–32.
- Enshell-Seijffers D, Denisov D, Groisman B, Smelyanski L, Meyuhas R, Gross G. (2003).The mapping and reconstitution of a conformational discontinuous B-cell epitope of HIV-1. *JMol Biol*; 334(1):87–101.
- Espanel X, Wälchli S, Rückle T, Harrenga A, Huguenin-Reggiani M & Hooft van Huijsduijnen R. (2003). Mapping of synergistic components of weakly interacting protein-protein motifs using arrays of paired peptides. *The Journal of biological chemistry*, 278(17), 15162-7.
- Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B & Possani LD. (2009). Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. *Journal of proteomics*, 72(2), 183-99.
- Etchebest C, Benros C, Hazout S, de Brevern AG. (2005). A structural alphabet for local protein structures: improved prediction methods. *Proteins.* Jun 1;59(4):810-27

- Feng L, Gao R, & Gopalakrishnakone P. (2008). Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148, 250-257.
- Fletcher PL, Fletcher MD, Weninger K, Anderson TE & Martin BM. (2010). Vesicle-associated Membrane Protein (VAMP) Cleavage by a New Metalloprotease from the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7405-7416.
- Foex B & Wallis L. (2005). Scorpion envenomation : does administration of antivenom alter outcome ? Scorpion envenomation : does antivenom reduce serum venom concentrations ? *Emergency Medicine*, 195-197.
- Fontecilla-Camps JC, Habersetzer-Rochat C & Rochat H. (1988). Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *PNAS*, 85, 7443-7447.
- Fourquet P, Bahraoui E, Fontecilla-Camps JC, Van Rietschoten J, Rochat H, Granier C. (1988). Immunochemistry of scorpion toxins. Synthesis and antigenic properties of a model of a loop region specific to alpha-toxins. *Int J Pept Protein Res*, 32(2):81-8.
- Gao B, Xu J, Rodriguez MDC, Lanz-Mendoza H, Hernández-Rivas R, Du W, Zhu S. (2010). Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie*, 92(4), 350-9.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press pp. 571-607
- Gazarian KG, Gazarian T, Hern R & Possani LD. (2005). Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*, 23, 3357-3368.
- Ghalim N, El-Hafny B, Sebti F, Heikel J, Lazar N, Moustansir R, Benslimane A . (2000). Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *American Journal of Tropical Medicine*, 62(2), 277-283.
- Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MAM. Effects of Tityustoxin on central nervous system. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, 14, 437-456. 1995a.
- Gordon D, & Gurevitz M. (2003). The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. *Toxicon*, 41(2), 125-8.

- Gordon D, Karbat I, Ilan N, Cohen L, Kahn R, Gilles N, Dong K, Stühmer W, Tytgat J, Gurevitz M. (2007). The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon*. Mar 15;49(4):452-72. Epub 2006 Nov 28.
- Granier C, Novotny J, Fontecilla-Camps JC, Fourquet P, el Ayeb M, Bahraoui E. (1989). The antigenic structure of a scorpion toxin. *Mol Immunol*. Jun;26(6):503-13.
- Granier C, Moreau M, Chavez-Olortegui C, El Ayeb M (2009) Immunochemical properties of scorpion alpha-toxins – Their use for diagnostic and therapy of scorpion stings. *Animal toxins: State of the Art – Perspectives in health and biotechnology*. Editora UFMG – Belo Horizonte
- Guatimosim SC, Kalapothakis E, Diniz CR & Chavez-Olortegui. (2000). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon* 38, 113-121
- Guatimosim SC, Prado VF, Diniz CR & Chavez-Olortegui C. (1999). Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp : an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 37, 507-517.
- Guerra CMN, Carvalho LFA, Colosimo EA & Freire HBM. (2008). Analysis of variables related to fatal outcomes of scorpion envenomation in children and adolescents in the state of Minas Gerais , Brazil , from 2001 to 2005. *Jornal de Pediatria*, 84(6), 509-515.
- Gurevitz M, Gordon D, Ben-Natan S, Turkov M & Froy O (2001). Diversification of neurotoxins by C-tail “wiggling”: a scorpion recipe for survival. *The FASEB*, 15(7), 1201-5.
- Haber, E. (1968). *Immunochemistry*. Annual Reviews in Biochemistry, 37, 497-520.
- Halperin I, Wolfson H, Nussinov R. (2003). SiteLight: binding-site prediction using phage display libraries. *Protein Sci*; 12(7):1344–59.
- Hamed MI.(2003). Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, 170-174.
- Hammoudi-Triki D, Ferquel E, Robbe-Vincent A, Bon C, Choumet V & Laraba-djebari F. (2004). Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria : effect of immunotherapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 240-250.

- Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA. (1998), What can toxins tell us for drug discovery?, *Toxicon*, Vol. 36(11), pp. 1635– 1640.
- Heidelberger M. (1967). Some contributions of immunochemistry to biochemistry and biology. *Annual Reviews in Biochemistry*, 36, 1-13.
- Hernández R, Gazarian TG, Hérion PS, Gazarian KG (2002). Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. *Immunol Lett.* Feb 1;80(2):97-103.
- Hijnen M, Van Zoelen DJ, Chamorro C, Van Gageldonk P, Mooi FR, Berbers G, Liskamp RMJ (2007). A novel strategy to mimic discontinuous protective epitopes using a synthetic scaffold. *Vaccine*, 1-11.
- Horta FMB, Caldeira AP & Sares JAS. (2007). Escorpionismo em crianças e adolescentes: aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes hospitalizados. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, 40(3), 351-353.
- Houssset D, Habersetzer-Rochat C, Astier JP, Fontecilla-Camps JC. (1994) Crystal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector refined at 1.3 Å resolution. *J Mol Biol.* Apr 22;238(1):88-103.
- Huang R, Han L, Li J, Liu S, Shao K, Kuang Y, Hu X, Wang X, Lei H, Jiang C. (2011). Chlorotoxin-modified macromolecular contrast agent for MRI tumor diagnosis. *Biomaterials* Aug;32(22):5177-86.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M. (2001) *Immunobiology*. 5a edição. Garland Science.
- Juste M, Martin-Eauclaire MF, Devaux C, Billiald P & Aubrey N. (2007). Using a recombinant bispecific antibody to block Na⁺ -channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 206-218.
- Kahn R, Karbat I, Ilan N, Cohen L, Sokolov S, Catterall WA, Gordon D, Gurevitz M . (2009). Molecular requirements for recognition of brain voltage-gated sodium channels by scorpion alpha-toxins. *The Journal of biological chemistry*, 284(31), 20684-91.
- Kalopothakis E & Chavez-Olortegui C. (1997). Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* 35(97), 1523-1529.
- Karbat I, Frolow F, Froy O, Gilles N, Cohen L, Turkov M, Gordon D, Gurevitz M . (2004). Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), 31679-86.

- Karbat I, Kahn R, Cohen L, Ilan N, Gilles N, Corzo G, Froy O, Gur M, Albretch G, Heinemann SH, Gordon D & Gurevitz M. (2007). The unique pharmacology of the scorpion alpha-like toxin Lqh3 is associated with its flexible C-tail. *The FEBS journal*, 274(8), 1918-31.
- Keskin O, Ma B, Nussinov R. (2005). Hot regions in protein–protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *J Mol Biol*; 345(5):1281–94.
- Ketelsen A, Eriksson H.(2008). Sensitive detection of hydrophobic antigens using a novel lipid-aggregate based ELISA. *J Immunol Methods*. Dec 31;339(2):195-204
- Kharrat R, Zemouaqi I, Lasfar ZB, Miled K, El Ayeb M.(1997). Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxin polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. *Toxicon*; 35:915-929
- King GF, Gentz MC, Escoubas P & Nicholson GM .(2008). A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52(2), 264-76.
- Kopeyan C, Martinez G, Lissitzky S, Miranda F & Rochat H. (1974). Disulfide bonds of toxin II of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 47(3), 483-9.
- Krifi MN, Kharrat H, Zghal K, Abdouli M, Abroug F, Bouchoucha S, Dellagi K & El Ayeb M. (1998). Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (AAG) and *Buthus occitanus tunetanus* (BOT): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon*, 36(6), 887-900.
- Krifi MN, Savin S, Debray M, Bon C, El Ayeb M & Choumet V. (2005). Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon*, 45, 187-198.
- Krifi MN, Miled K, Abderrazek M & El Ayeb M. (2001). Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics : towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon*, 39, 1317-1326.
- Krishnan A, Sonawane RV, Karnad DR.(2007).Captopril in the treatment of cardiovascular manifestations of indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus concanensis* Pocock) envenomation. *J Assoc Physicians India*. Jan;55:22-6.
- Kulkarni-Kale U, Bhosle S, Kolaskar AS. (2005).CEP: a conformational epitope prediction server. *Nucleic Acids Res*. Jul 1;33
-

- Laune L, Molina F, Ferrieres G, Vllard S, Bés C, Rieunier F, Chardes T, Granier C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunol. Method*; 267:53-70.
- Legros C, Céard B, Vacher H, Marchot P, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. (2005). Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. *Biochim Biophys Acta* May 25;1723(1-3):91-9.
- Li C, Liu M, Monbo J, Zou G, Li C, Yuan W, Zella D, Lu WY & Lu W (2008). Turning a scorpion toxin into an antitumor miniprotein. *Journal of the American Chemical Society*, 130(41), 13546-8.
- Lima EG & Freire-Maia L. (1977). Cardiovascular and respiratory effects induced by intracerebroventricular injection of scorpion toxin (Tityustoxin) in the rat. *Toxicon*, 15(3), 225-234.
- Liu LH, Bosmans F, Maertens C, Zhu RH, Wang DC, Tytgat J. (2005). Molecular basis of the mammalian potency of the scorpion alpha-like toxin, BmK M1. *Faseb. J.* 19, 594–596.
- Lira-da-Silva RM, Amorim A M & Brazil TK. (2000). Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones ; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(3), 239-245.
- Lourenço WR.(2001).The scorpion families and their geographical distribution. *J Venom Anim Toxins* ; 7
- Lourenço WR, Cloudsley-Thompson JL, Cuellar O, Von Eickstedt VRD, Barraviera B, Knox MB. (1996) The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *J Ven Anim and Tox* 2, 121-13.
- Lourenço WR, Cuellar O. (1996). Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. *Journal of Venomous Animals and Toxins*,; 1
- Maccallum RM, Martin ACR & Thornton JM. (1996). Antibody-antigen Interactions : Contact Analysis and Binding Site Topography. *Journal of Molecular Biology*, 262, 732-745.
- Machado-de-Avila RA, Alvarenga LM, Tavares CAP, Molina F, Granier C & Chavez Olortegui C. (2004). Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, 44, 233-241.
- MacNalty AS, von Behring E. (1854-1917): Medicine's first Nobel laureate. *British Medical Journal*, 20(1), 668-671.

- Mamelak AN, Rosenfeld S, Bucholz R, Raubitschek A, Nabors LB, Fiveash JB, Shen S, Khazaeli MB, Colcher D, Liu A, Osman M, Guthrie B, Schade-Bijur S, Hablitz DM, Alvarez VL, Gonda MA.(2006). Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol.*;24:3644-50.
- Marangoni S, Ghiso J, Sampaio SV, Arantes EC, Giglio JR, Oliveira B, Frangione B.(1990). The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *J Protein Chem.* Oct;9(5):595-601.
- Maria WS, Velarde DT, Alvarenga LM, Nguyen C , Villard S, Granier C & Chavez-Olortegui C (2005). Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon*, 46, 210-217.
- Mariuzza RA, Phillips SE & Poljak RJ. (1987). The structural basis of antigen-antibody recognition. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 16, 139-59.
- Martin-Eauclaire MF, Céard B, Ribeiro AM, Diniz CR, Rochat H & Bougis PE. (1994). 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.
- Martin-Eauclaire MF, Alami M, Giamarchi A, Missimilli V, Rosso J & Bougis PE. (2006). Short communication: A natural anatoxin , Amm VIII , induces neutralizing antibodies against the potent scorpion α -toxins. *Vaccine*, 24, 1990-1996.
- Massenssini AR, Moraes-Santos T, Gomez MV, Romano-Silva MA. (1998). α and β -scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. *Neuropharmacol.* 37(3), 289-297.
- Meki ARAM, Hasan HA, El-Deen ZMM, Bakar S.(2003). Dysregulation of apoptosis in scorpion envenomed children: its reflection in their outcome. *Toxicon*; 42:229-237.
- Meloen RH, Puijk WC, Slootstra JW. (2000). Mimotopes: realization of an unlikely concept. *J Mol Recognit*; 13(6):352–9.
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. (1996). Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice. *Eur. J. Immunol.* 26(10):2470-2479
- Mendes TM, Dias F, Horta CCR, Pena IF, Arantes EC & Kalapothakis E. (2008). Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon.* Dec 1;52(7):787-93.

- Mendes TM, Maria WS, Granier C, Chavez-Olortegui C & Kalapothakis E. (2004). Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse , rabbit and sheep antibodies. *Toxicon*, 44, 617-624.
- MeSH - Medical Subject Headings-NLM controlled vocabulary thesaurus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/> Acesso em junho de 2011
- Merrifield RB. (1963). Peptide synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*; 85:2149.
- Méry J, Granier C, Juin M, Brugidou J.(1993). Disulfide linkage to polyacrylic resin for automated Fmoc peptide synthesis. Immunochemical applications of peptide resins and mercaptoamide peptides. *Int J Pept Protein Res.* Jul;42(1):44-52.
- Ministério da Saúde. Tabulação de dados Sistema de informação de agravos de notificação (SINAN), 2006. Acesso em junho de 2011. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
- Miranda F, Kupeyan C, Rochat H, Rochat C, Lissitzky S.(1970). 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.* Nov;16(3):514-23.
- Moreau V, Fleury C, Piquer D, Nguyen C, Novali N, Villard S,Laune D, Granier C & Molina F. (2008). PEPOP : Computational design of immunogenic peptides. *BMC Bioinformatics*, 15, 1-15.
- Moreau V, Granier C, Villard S, Laune D, Molina F.(2006). Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. *Bioinformatics*; 22(9):1088–95.
- Moreira-Ferreira ANAMB, Kalapothakis E, Diniz CR & Chavez-Olortegui C. (1998). In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non toxic protein. *Toxicon*, 36(2), 333-339.
- Mosby's Medical Dictionary, 8th Edition; Mosby Elsevier; St. Louis, Missouri; 2009
- Mousli M, Devaux C, Rochat H, Goyffon M & Billiald P. (1999). A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Letters*, 442, 183-188.
- Negi S, Braun W. (2009). Automated detection of conformational epitopes using phage display peptide sequences. *Bioinform Biol Insights*; 3:71–81.
- Newcombe C & Newcombe AR. (2007) Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of Chromatography B*, 848 2–7

- Nisonoff A & Thorbecke J. (1964). *Immunochemistry. Annual Reviews in Biochemistry*, 33(60), 355-402.
- Nygren H, & Stenberg M. (1989). *Immunochemistry at interfaces. Immunology*, 66(3), 321-7.
- Ozkan O & Carhan A. (2008). The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Toxicon*, 52, 375-379.
- Pal A, Chakrabarti P, Bahadur R, Rodier F & Janin J. (2007). Peptide segments in protein-protein interfaces. *Journal of Bioscience*, 32(January), 101-111.
- Pardal PPO, Castro LC, Jennings E, Pardal JSO & Monteiro MRCC. (2003). Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(3), 349-353.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA.(2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. Jul 10
- Pessini AC, Takao T T, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes EC. (2001). A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom : isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, 39, 1495-1504.
- Pessini AC, Santos DR, Arantes EC, Souza GE.(2006). Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*.;48:556-66.
- Petricevich VL, & Reynaud E. (2008). Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 415-423.
- Petricevich VL.(2010). Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation* Article ID 903295.
- Pimenta AMC, Stocklin R, Favreau P, & Bougis PE, Martin-Eauclaire MF (2001). Moving pieces in a proteomic puzzle : mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus*, *Rapid Commun Mass Spectr* 15 1562-1572.
- Plessis LH, Elgar D & Plessis JL. (2008). Southern African scorpion toxins : An overview. *Toxicon*, 51, 1-9.
- Possani, L D. (2000). Antivenom for scorpion sting. *The Lancet*, 355, 2000-2000.
- Possani LD, Becerril B, Delepierre M & Tytgat J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European journal of biochemistry / FEBS*, 264(2), 287-300.

- Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado MDFD, & Tambourgi DV. (2008). Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. *Toxicon*, 52(8), 842-51.
- Rajam G, Sampson J, Carlone GM, Ades EW. (2010). An augmented passive immune therapy to treat fulminant bacterial infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* Jun 1;5(2):157-67.
- Rates B, Ferraz KK, Borges MH, Richardson M, DeLima ME & Pimenta AMC. (2008). *Tityus serrulatus* peptidomics: accessing venom peptide diversity. *Toxicon.* Oct;52(5):611-8.
- Reineke U, Sabat R, Hoffmuller U, Schmidt M, Kurzhals D, Wenschuh H, Volk HD, Germeroth L, Schneider-Mergener J.(2000). Identification of miniproteins using cellulose-bound duotope scans. In: Fields, G.B., et al. (Eds.), *Peptides for the New Millenium*, Proc. 16th Amer. Peptide Symp. 1999. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, p. 167.
- Reineke U, Sabat R, Misselwitz R, Welfle H, Volk HD, & Schneider-Mergener J. (1999). A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nature Biotechnology*, 271-275.
- Reineke U, Sabat R, & Volk HD, Schneider-Mergener J (1998). Mapping of the interleukin-10/interleukin-10 receptor combining site. *Protein Science* . 7951-960.
- Revelo MP, Bambirra EA, Ferreira AP, Diniz CR & Chavez-Olortegui C. (1996). Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom . *Toxicon*, 34(10), 1119-1125.
- Rezende NA, Chávez-Olórtegui C, Amaral CFS. (1996). Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? *Toxicon*; 34: 820-823
- Rjeibi I, Mabrouk K, Mosrati H, Berenguer C, Mejdoub H, Villard C, Laffitte D, Bertin D, Ouafik L, Luis J, El Ayeb M, Srairi-Abid N. (2011). Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides.* Apr;32(4):656-63
- Rochat H, Rochat C, Sampieri F, Miranda F, Lissitzky S. (1972). The amino-acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis* Hector. *Eur J Biochem.* Jul 24;28(3):381-8.
- Rodriguez de la Vega RC, García BI, Ambrosio CD, Diego-García E, Scaloni A, & Possani LD. (2004). Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 1507- 1519.

- Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. (2004) Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon* 43, 865-875
- Rodríguez de la Vega RC, & Possani LD. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 46(8), 831-44.
- Rogers DF. (1996). Science matters: Scorpion venoms : taking the sting disease of lung. *American Review Of Respiratory Disease*, 546-548.
- Romero NO, Hernandez TJM. (2005).Cerebral edema associated to scorpion sting: a two-case sting report. *J Venom Anim Toxin Incl Trop Dis*; 11: 594-600.
- RossoJP, RochatH.(1985).Characterization of ten proteins fromthe venom ofthe Moroccan scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, six of which are toxic to the mouse.*Toxicon* 23(1):113-25.
- Roodt ARD, Laskowicz RD, Reati GJ, Salomo OD, Beltramino C. (2010). *Toxicon* General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. *Toxicon*, 55, 307-319.
- Rubinstein ND, Mayrose I, Martz E, Pupko T. (2009). Epitepia: a web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics*. 10:287.
- Sali A, Blundell TL. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234:779-815.
- Schreiber A, Humbert M, Benz A, Dietrich U.(2005). 3D-epitope-explorer (3DEX): localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins. *J Comput Chem*; 26(9):879-87.
- Schroeder T, Haas R, Kobbe G.(2010)Treatment of graft-versus-host disease with monoclonal antibodies and related fusion proteins.*Expert Rev Hematol*. Oct;3(5):633-51.
- Shinnick TM, Sutcliffe JG, Green N, Lerner RA.(1983). Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Ann. Rev. Microbiol*; 37:425-446.
- Smith GD, Blessing RH, Ealick SE, Fontecilla-Camps JC, Hauptman HA, Housset D, Langs DA, Miller R. (1997). Ab initio structure determination and refinement of a scorpion protein toxin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. Sep 1;53(Pt 5):551-7.
- Soares MRM, Azevedo CSD, & Maria MD (2002). Escorpionismo em Belo Horizonte , MG : um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4), 359-363.

- Song YM, Tang XX, Chen XG, Gao BB, Gao E, Bai L . (2005). Effects of scorpion venom bioactive polypeptides on platelet aggregation and thrombosis and plasma 6-keto-PG F 1a and TXB 2 in rabbits and rats. *Toxicon*, 46, 230-235.
- Soulaymani-Bencheikh R, Faraj Z, Semlali I, Khattabi A, Skalli S, Benkirane R, Badri M. (2002) . Epidemiological aspects of scorpion stings in Morocco. *Rev Epidemiol Sante Publique.Sep*;50(4):341-7.
- Sousa LD, Boadas J, Kiriakos D, Borges A, Boadas J, Marcano J. (2007). Scorpionism due to *Tityus neoespartanus* (*Scorpiones* , *Buthidae*) in Margarita Island , northeastern Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(6), 681-685.
- Srairi-Abid N, Mansuelle P,Mejri T, Karoui H,Rochat H, Sampieri F,El Ayeb M.(2000). Purification, characterization and molecular modelling of two toxin-like proteins from the *Androctonus australis* Hector venom. *Eur J Biochem*. 267(17):5614-20.
- Sun YM, Bosmans F, Zhu RH, Goudet C, Xiong YM, Tytgat J. (2003). Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion alpha-like toxin BmK M1: the hydrophobic surface region revisited. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), 24125-31.
- Sun Y M, Liu W, Zhu RH, Goudet C, Tytgat J, Wang DC. (2002). Roles of disulfide bridges in scorpion toxin BmK M1 analyzed by mutagenesis. *J Pept Res*. Nov;60(5):247-56.
- Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES).(2007). Manejo integrado para prevenção da proliferação de vetores da dengue e leishmaniose e de escorpiões. *Rev Saúde Pública*, 41: 317-320
- Tan PJ, Khan AM & Brusic V. (2003). Bioinformatics for venom and toxin sciences. *Briefings in Bioinformatics*, 4(1), 53-62.
- Tarasiuk A, Menascu S & Sofer S. (2003). Antivenom serotherapy and volume resuscitation partially improve peripheral organ ischemia in dogs injected with scorpion venom. *Toxicon*, 42, 73-77.
- Teixeira AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CR, Camargos ER, Teixeira MM. (2001). Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*. May;39(5):703-9.
- Teixeira CE, Oliveira JF, Baracat JS, Priviero FBM, Okuyama CE, Rodrigues Netto Jr N. (2004). Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology*, 63(1), 184-189.
- Theakston RDG, Warrel DA, Griffiths E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*; 41: 541-557

- TianC, YuanY, ZhuS.(2008).Positively selected sites of scorpion depressant toxins: possible roles in toxin functional divergence. *Toxicon*. Mar 15;51(4):555-62. Epub 2007 Nov 22.
- Torres JB, Marques GB, Martini RK, & Borges CVA. (2002). Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Revista de Saúde Pública*, 36(5), 2001-2003.
- Van Regenmortel MHV. (2009). What Is a B-Cell Epitope ? *Methods in Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols* (Vol. 524, pp. 59745-59745).
- Van Regenmortel MHV.(1996). Mapping epitope structure and activity: from one-dimensional prediction for four-dimensional description of antigenic specificity. *Methods*; 9: 465-472
- Van Regenmortel MHV & Pellequer JL. (1994). Predicting antigenic determinants in proteins: looking for unidimensional solutions to a three-dimensional problem? *Peptide Research*, vol. 7, no. 4, pp. 224–228, 1994.
- Verano-Braga T, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE. (2008). *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(3), 515-20.
- Von Eickstedt VRD, Ribeiro LA, Candido DM, Albuquerque MJ, Jorge MT.(1996). Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo – Brazil. *Ven Anim Tox*; 2: 92-105
- Wang CY, Tan ZY, Chen B. (2000), Antihyperalgesia effect of BmK IT2, a depressant insect-selective scorpion toxin in rat by peripheral administration, *Brain Res. Bull.*, Vol. 53(3), pp. 335–338.
- Wang CG, Gilles N, Hamon A, Le Gall F, Stankiewicz M, Pelhate M, Xiong YM, Wang DC, Chi CW.(2003), Exploration of the functional site of a scorpion alpha-like toxin by site-directed mutagenesis.*Biochemistry*. Apr 29;42(16):4699-708
- Weinberger H, Moran Y, Gordon D, Turkov M, Kahn R, & Gurevitz M. (2010). Positions under positive selection--key for selectivity and potency of scorpion alpha-toxins. *Molecular biology and evolution*, 27(5), 1025-34.
- West PL, & Hendrickson RG. (2009). Scorpions on a plane? A case series of non-endemic scorpion envenomations. *JEM*, xx(x), 4679-4679.
- WHO. (2007). Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting. World Health Organization, (January).
-

Ye X, Bosmans F, Li C, Zhang Y, Wang DC, Tytgat J. (2005). Structural basis for the voltage-gated Na⁺ channel selectivity of the scorpion alpha-like toxin BmK M1. *JMol Biol*; 353(4):788–803.

Zlotkin E, Fishman Y, Elazar M.(2000). AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Sep-Oct*;82(9-10):869-81.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. ARTIGOS PUBLICADOS

A primeira parte deste trabalho foi compilada em um artigo publicado em 2010, na VACCINE, do qual fui primeira autora, intitulado: “In vivo protection against Tityus serrulatus scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope”, **Clara Guerra Duarte**, Larissa Magalhães Alvarenga, Camila Dias-Lopes, Ricardo Andrés Machado-de-Ávila, Christophe Nguyen, Frank Molina, Claude Granier, Carlos Chávez-Olórtegui, anexado a seguir.

A segunda parte foi compilada em uma artigo publicado também publicado em 2010, na VACCINE, do qual fui colaboradora, intitulado: “Design of antibody-reactive peptides from discontinuous parts of scorpion toxins”, L. Alvarengaa, V. Moreau, L. Felicori, C. Nguyen, **C. Duarte**, C. Chavez-Olortegui, F. Molina, M.-F. Martin-Eauclaire, C. Granier, também anexado a seguir.

8.2. Outros trabalhos gerados durante a realização desta tese

Além dos acidentes escorpiônicos, o loxoscelismo, acidentes causados pelas aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas como aranha-marrom, também constituem um grave problema de saúde pública no Brasil. Visando a produção de soro mais potente e específico, o uso de peptídeos sintéticos como imunógenos, para produzir resposta de anticorpos em coelhos foi testado. Após mapeamento pelo método de SPOT, seis regiões antigênicas foram mapeadas e sintetizadas para a imunização de coelhos. Foi possível verificar a produção de anticorpos que reagiram cruzadamente com a LiD1, principal toxina do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, entretanto, apenas um dos seis peptídeos utilizados se mostrou imunogênico. As atividades dermonecrotica, hemorrágica e edematogênia induzidas pela injeção da LiD1 em coelhos não imunizados foram inibidas 82%, 35% e 35% respectivamente pela pré-incubação com os anticorpos anti-peptídeo preparados. A imunização combinada dos peptídeos com uma dose da LiD1 conferiu proteção mais eficiente. Esses resultados suportam a continuidade das investigações da utilização de peptídeos sintéticos para a produção de antivenenos.

Estes resultados obtidos foram compilados e publicados em 2009, na VACCINE, com o título “An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes”, Liza Felicoria, Paula B. Fernandes, Mario S. Giusta, **Clara G. Duarte**, Evanguedes Kalapothakis, Christophe Nguyen, Frank Molina, Claude Granier, Carlos Chávez-Olórtegui., em anexo.