

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DE UM EPITOPO DESCONTÍNUO DA TsNTxP:
uma anatoxina natural do veneno do escorpião
Tityus serrulatus.**

CLARA GUERRA DUARTE

BELO HORIZONTE

- Julho 2007-

CLARA GUERRA DUARTE

**IDENTIFICAÇÃO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DE UM EPITOPO DISCONTÍNUO DA TsNTxP:
uma anatoxina natural do veneno do escorpião
Tityus serrulatus.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, do departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

ORIENTADOR: PROF. CARLOS CHAVEZ-OLORTEGUI

BELO HORIZONTE

– Julho 2007-

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Carlos Chavez Olortegui, pela presença constante, pela confiança e pelo incentivo.

Ao Prof. Tomaz Aroldo dos Santos, pelos ensinamentos de um outro lado da imunologia.

À Dra. Larissa Alvarenga, por ter dado início a este trabalho, pela paciência e por ser um exemplo de profissional e de pessoa.

Ao Ricardo Andrez, pela ajuda com a modelagem, síntese, purificação e tantas outras coisas.

À Camila Dias Lopes, por toda a ajuda nos experimentos e pela amizade.

À Priscila Ribeiro Amim, pela disponibilidade e ajuda com os camundongos.

À Tatiana, pela ajuda com a sangria dos coelhos.

Aos demais colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas pela convivência agradável: Alessandra, Christina, Christiane, Danielle, Diogo Dulcilene, Eduardo, Eric, Leonardo, Liza, Mariana, Melina, Miguel, Paula, Raíssa, Rogério, Thiago.

A Rede Mineira de Biomoléculas, pelo uso do espectrômetro de massas.

Ao departamento de Bioquímica e Imunologia, por me proporcionar essa oportunidade de aprendizado tão valiosa.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Aos colegas do curso de Bases Moleculares, por compartilharem comigo essa jornada da Pós-graduação.

Aos colegas de Biologia, por estarem juntos nos momentos de desespero e de alegria que permeiam o caminho da pesquisa.

A minha família, pela torcida constante e pelo carinho.

Ao Felipe, meu porto seguro, pela compreensão e amor.

Às minhas queridas amigas de infância, por estarem sempre ao meu lado.

Ao Núcleo Artístico, por trazer um pouco de arte para a minha vida científica.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
1- INTRODUÇÃO.....	- 1 -
1.1- O escorpião.....	- 1 -
1.2- O veneno: composição e mecanismo de ação	- 4 -
1.3- Implicações médicas.....	- 8 -
1.4- O soro antiescorpiônico	- 11 -
1.5- TsNTxP	- 14 -
1.6- Mapeamento de epítopos.....	- 17 -
2- OBJETIVOS.....	- 22 -
2.1- Geral.....	- 22 -
2.2- Específicos	- 22 -
3- MATERIAIS E MÉTODOS	- 23 -
3.1- Animais e venenos.....	- 23 -
3.2- Método de SPOT	- 23 -

3.2.1- Síntese de peptídeos em membrana de celulose (SPOT synthesis) -	23
-3.2.2- Imunoensaio de SPOT	- 26 -
3.3- Modelagem molecular.....	- 27 -
3.4- Síntese solúvel de peptídeos	- 27 -
3.5- Imunizações.....	- 28 -
3.5.1- Preparação do Imunógeno	- 28 -
3.5.2- Imunizações	- 29 -
3.5.2.1- Camundongos.....	- 29 -
3.5.2.2- Coelhos.....	- 29 -
3.6- Determinação da LD₅₀.....	- 30 -
3.7- ELISA.....	- 30 -
3.8- Ensaio de neutralização	- 31 -
3.8.1- In vivo	- 31 -
3.8.2- In vitro.....	- 31 -
4- RESULTADOS	- 32 -
4.1- Identificação de epítopos descontínuos da TsNTxP.....	- 32 -
4.1.1- Ensaio de SPOT	- 32 -
4.1.2- Alinhamento da seqüência primária com as principais toxinas.....	- 34 -
4.1.3- Modelagem molecular	- 35 -
4.2- Síntese solúvel de peptídeos	- 37 -
4.3- Caracterização antigênica do diepitopo.....	- 39 -
4.4- Produção do imunógeno	- 40 -
4.5- Caracterização imunogênica do diepitopo identificado	- 41 -
4.5.1- Camundongos	- 41 -
4.5.1.1- Após 1 semana.....	- 41 -

4.5.1.2- Após 9 semanas	- 44 -
4.5.2- Coelhos	- 45 -
4.6- Ensaio de neutralização	- 47 -
4.6.1- <i>In vivo</i>	- 47 -
4.6.2- <i>In vitro</i>	- 48 -
4.7- Análise do soro de coelho OVA-Pep por SPOT.....	- 50 -
5- DISCUSSÃO	- 52 -
6- CONCLUSÕES.....	- 59 -
7- PERSPECTIVAS	- 60 -
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 61 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial dos escorpiões.....	- 1 -
Figura 2: Estrutura corporal de um escorpião.	- 2 -
Figura 3: Escorpião <i>Tityus serrulatus</i> (Lourenço et al. 1996).	- 3 -
Figura 4: Estrutura primária (P) de uma β -toxina, e seu arranjo conformacional (A e B).....	- 7 -
Figura 5: Desenho esquemático do canal de sódio.....	- 8 -
Figura 6: Gráfico demonstrando a reversão dos sintomas do envenenamento pelo tratamento com soro antiescorpiônico.....	- 11 -
Figura 7: Estrutura tridimensional da TsNTxP prevista por modelagem.	- 17 -
Figura 8: Síntese de uma membrana pelo método de SPOT.....	- 20 -
Figura 9: Robô ASP222, desenvolvido para a síntese de SPOT	- 20 -
Figura 10: Resultado do imunoenensaio de SPOT modificado para TsNTxP testada com soro neutralizante anti-TsNTxP de coelho.....	- 32 -
Figura 11: Identificação da região correspondente á seqüência do diepitopo nas estruturas primárias da TsNTxP e das principais toxinas do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	- 34 -
Figura 12: Localização espacial dos epitopos descontínuos na estrutura modelada da TsNTxP e das principais toxinas do veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	- 36 -
Figura 13: Análise molecular das distâncias (em Å) existentes entre as duas regiões que compõem o diepitopo.	- 36 -
Figura 14: Cromatograma referente à purificação do diepitopo manualmente sintetizado.	- 37 -
Figura 15: Gráfico referente á caracterização do diepitopo purificado por espectrometria de massas pelo método de ESI-TOF.	- 38 -
Figura 16: ELISA para a verificação da antigenicidade do peptídeo produzido. A placa foi sensibilizada com 1 μ g do peptídeo por well..	- 39 -
Figura 17: ELISA para a verificação da qualidade dos imunógenos OVA-Pep e Pep-Pep produzidos.....	- 41 -
Figura 18: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos anti-OVA-Pep em camundongos. imunogenicidade.....	- 42 -

Figura 19: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos anti-Pep-Pep em camundongos.....	- 43 -
Figura 20: ELISA para a comparação dos imunógenos OVA-Pep e Pep-Pep produzidos.....	- 43 -
Figura 21: ELISA para a verificação da persistência da resposta aos imunógenos produzidos em camundongos.....	- 44 -
Figura 22: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos contra os imunógenos produzidos em coelhos.	- 46 -
Figura 23: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos contra os imunógenos produzidos em coelhos após dose de reforço...	- 46 -
Figura 24: Resultado do imunoensaio de SPOT modificado para TsNTxP testado com soro anti-OVA-Pep de coelho..	- 51 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas mais freqüentes nos acidentes escorpiônicos.-	
10 -	
Tabela 2: Seqüências dos peptídeos descontínuos da TsNTxP sintetizados em	
membrana de celulose. -	24 -
Tabela 3: Seqüências dos peptídeos descontínuos reativos identificados por	
SPOT. -	33 -
Tabela 4: Número de animais desafiados sobreviventes em ensaios de	
neutralização in vivo..... -	48 -
Tabela 5: Demonstração da sintomatologia tempo de morte apresentada pelos	
grupos de camundongos no ensaio de neutralização in vitro com 3 LD ₅₀ .-	
49 -	
Tabela 6: Demonstração da sintomatologia tempo de morte apresentada pelos	
grupos de camundongos no ensaio de neutralização in vitro com 1LD ₅₀ -	
50 -	
Tabela 7: Seqüências dos peptídeos conformacionais reativos identificados por	
SPOT. -	51 -
Tabela 8: Resíduos de aminoácidos críticos na antigenicidade da TsNTxP e de	
toxinas do veneno de <i>T. serrulatus</i> (Chavez-Olortegui et al. 2002). -	55 -

LISTA DE ABREVIATURAS

aa=	Aminoácidos
BCIP=	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA=	<i>Bovine serum albumin</i>
CBS=	<i>Citrate buffer saline</i>
DIPC=	Diisopropilcarbodiimida
DMF=	Dimetilformamida
ELISA=	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI-TOF=	<i>Electrospray ionization time of flight</i>
F-Moc =	Fluorenil metil oxicarbonila
F-moc-βAla-OH =	Beta alanina ligada a F-moc
HOBT=	Hidroxibenzotriazol
HPLC=	<i>High performance liquid chromatography</i>
KLH=	<i>Keyhole limphet hemocyanin</i>
LD50=	Dose letal para 50%
MBP=	<i>Maltose binding protein</i>
MTT=	Bromídio de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium
OPD=	Ortofenilenodiamino
OVA=	Ovalbumina
OVA-Pep=	Peptídeo carreado á ovalbumina
PAGE=	<i>Poliacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS=	<i>Phosphate buffer saline</i>
Pep-Pep=	Peptídeo polimerizado
RIA=	<i>Radioimmuno assay</i>
SDS=	Sodio dodecil sulfato

sMCC=	N-succinimidil-4-(maleidimidometil) ciclohexano carboxilato
TBS=	<i>Tris Buffer Saline</i>
Tris=	2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol
TsII=	Tityus toxina II (Ts2 ou Ts III-8)
TsIV=	Tityus toxina IV (Ts3 ou Ts IV-5)
TsVII=	Tityus toxina VII (Ts1 ou toxina gama)
TsNTxP=	<i>Tityus serrulatus non-toxic protein</i>

RESUMO

O envenenamento pelo escorpião *Tityus serrulatus* é um problema de saúde pública no Brasil, especialmente no estado de Minas Gerais. TsNTxP é uma proteína não tóxica e imunogênica do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* que possui a propriedade de gerar anticorpos neutralizantes do veneno total cognato. O método de SPOT de síntese múltipla de peptídeos foi utilizado para preparar em membrana de celulose, 153 octadecapeptídeos sobrepostos cobrindo a seqüência completa da TsNTxP, para mapear seus possíveis epitopos conformacionais. Anticorpos neutralizantes de coelho anti-TsNTxP revelaram que GREGYPADGGGLPDSVKI é um epitopo imunodominante. Esse epitopo contém duas regiões antigênicas da TsNTxP, uma parte N-terminal (resíduos 1–8 (GREGYPAD)) e outra na porção C-terminal (resíduos 47–54 (GLPDSVKI)). Após a síntese e purificação, anticorpos contra esse diepitopo conjugado à ovalbumina foram gerados em camundongos BALB/c. Ensaio de proteção *in vivo* feitos uma semana após a última dose da imunização mostrou que os camundongos resistiram ao desafio de 3 LD₅₀ do veneno total de *T. serrulatus*, uma dose que matou todos os camundongos controle não imunizados. Os camundongos imunizados com o diepitopo desenvolveram uma resposta que persistiu por nove semanas após o término do protocolo de imunização. A imunização de coelhos com o mesmo imunógeno produziu anticorpos específicos que, apesar de serem capaz de retardar os sintomas de envenenamento e o tempo de morte, não foram tão eficientes na neutralização dos efeitos letais do veneno.

PALAVRAS CHAVES: mapeamento de epitopos, peptídeos sintéticos, TsNTxp, *Tityus serrulatus*.

ABSTRACT

Envenoming by the scorpion *Tityus serrulatus* is a major health problem in Brazil, especially in the state of Minas Gerais. TsNTxP is a non-toxic and immunogenic protein from the venom of scorpion *Tityus serrulatus* which has the property to elicit neutralizing antibodies against the whole venom. The SPOT method of multiple peptide synthesis was used to prepare, on cellulose membranes, a hundred and fifty three overlapping octadecapeptides covering the complete amino acid sequence of TsNTxP in order to map possible conformational epitopes. Anti-TsNTxP neutralizing rabbit antibodies revealed that GREGYPADGGGLPDSVKI is one immunodominant diepitope. This epitope contains two antigenic regions of the TsNTxP, one in the N-terminal part (residues 1–8 (GREGYPAD)) and the other in the C-terminal part (residues 47–54 (GLPDSVKI)). After synthesis and purification, antibodies were raised in BALB/c mice against the diepitope conjugated to ovalbumin (OVA) with glutaraldehyde. *In vivo* protection assays one week after the last immunization showed that immunized mice could resist the challenge of three-fold the LD₅₀ of the *T. serrulatus* whole venom, a dose that killed all control non-immune mice. The mice immunized with this preparation developed an antibody response that persisted nine weeks after the end of the immunization protocol. Rabbit immunization with the same immunogen produced specific antibodies that weren't very efficient in neutralizing the lethal effects of the venom, although they were capable of retarding the envenoming symptoms and the time of death.

KEY WORDS: epitope mapping. synthetic peptides, TsNTxP, *Tityus serrulatus*.

1-INTRODUÇÃO

1.1- O escorpião

Os escorpiões são animais pertencentes ao filo dos artrópodes, classe Scorpionida, que se diferenciaram a mais de 400.000 anos na evolução (Gazarian et al. 2005). Esses animais possuem glândulas produtoras de veneno, substância que é utilizada como mecanismo de defesa e estratégia para captura de presas mediante a sua inoculação por estruturas anatômicas especializadas.

Cerca de 1500 espécies de escorpião já foram descritas até o momento. Elas se encontram distribuídas por todo o globo, exceto na Antártida, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Fig.1). Ocorrem em vários tipos de ambientes terrestres, sendo encontrados desde regiões desérticas até florestas tropicais úmidas passando pelos ambientes urbanos (Lourenço, 2001).

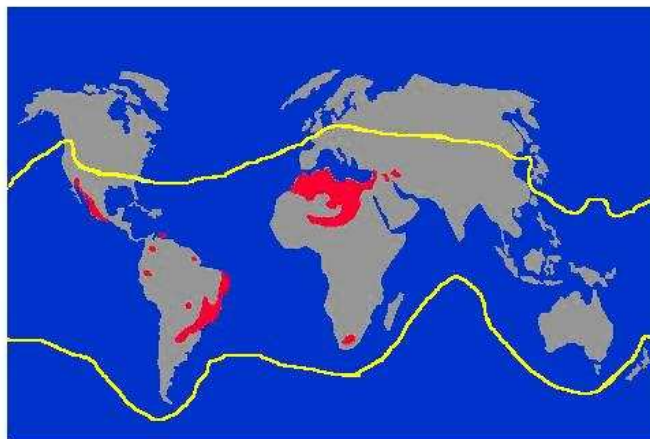


Figura 1: Distribuição mundial dos escorpiões. A linha amarela delimita as áreas de ocorrência de escorpiões. As áreas destacadas em vermelho mostram regiões de grande incidência de escorpionismo (Lourenço, 2001).

Das espécies já identificadas, 50 são consideradas perigosas ao homem, todas pertencentes à família Buthidae. Dentro deste grupo, os gêneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Buthotus* e *Heterometrus*, denominados

escorpiões do Velho Mundo, são os principais causadores de acidentes no norte da África, Oriente Médio e Índia. O gênero *Parabuthus* é importante na África do Sul. No chamado Novo Mundo, prevalece o gênero *Centruroides* no México e sul dos EUA e o gênero *Tityus*, em Trinidad e Tobago, Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (Gazarian, 2005).

Os escorpiões apresentam o corpo formado pelo tronco (prossoma e mesossoma) e pela cauda (metassoma). O prossoma é coberto dorsalmente por uma carapaça onde se articulam quatro pares de pernas, um par de quelíceras e um par de pedipalpos. O mesossoma apresenta sete segmentos dorsais, os tergitos, e cinco ventrais, os esternitos. A cauda ou metassoma é formada por cinco segmentos e no final da mesma situa-se o telson, estrutura formada pela vesícula e pelo acúleo oco. A vesícula contém duas glândulas de veneno e estas se ligam através de dois canais a duas aberturas perto do final do telson, por onde o veneno é excretado e inoculado através do orifício formado pela picada do acúleo (Lutz & Mello, 1922) (Fig 2.)

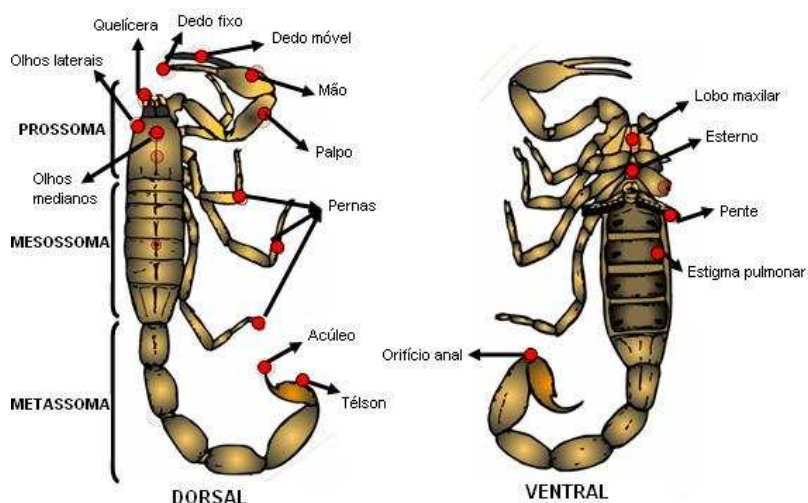


Figura 2: Estrutura corporal de um escorpião. Representação esquemática das estruturas e da divisão corporal do animal em vista dorsal (esquerda) e ventral (direita)

No Brasil, onde prevalece o gênero *Tityus*, a espécie *Tityus serrulatus* é a maior responsável por envenenamentos, sendo considerado o escorpião mais perigoso da América do Sul. Ele é popularmente conhecido como escorpião amarelo, devido à coloração de seus apêndices, e foi descrito em

1922 por Lutz e Mello (Lutz & Mello, 1922). Mede cerca de 6-7 cm de comprimento e no último segmento corporal apresenta uma serrilha que originou o nome *serrulatus*. (Fig. 3)



Figura 3: Escorpião *Tityus serrulatus* (Lourenço 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). Isso é explicado em parte pelo fato de que, diferente da maioria dos escorpiões que se encontram adaptados a nichos naturais específicos, o *T.serrulatus* é uma espécie oportunista, altamente plástica, capaz de se adaptar a ambientes colonizados pelo homem. A crescente urbanização e desmatamento têm, portanto, favorecido a dispersão dessa espécie a ambientes inicialmente não habitados por ela. A ausência de predadores naturais, como macacos, quatis, siriemas, sapos e rãs, também contribui para o sucesso do estabelecimento do *T.serrulatus* nas cidades (Soares et al. 2002). Os hábitos urbanos desse animal propiciam um maior número de encontros acidentais com o homem levando a um maior número de envenenamentos reportados, sendo que muitos destes ocorrem dentro de domicílios (Amorim et al. 2003).

Além de sua plasticidade, o *T.serrulatus* se reproduz por partenogênese, ou seja, não é necessário o acasalamento para a reprodução. O período gestacional não é superior a 3 meses, e são gerados em média 10 descendentes por geração (Lourenço & Cuellar, 1996). Isso confere a esse escorpião um alto potencial reprodutivo em relação às demais espécies.

As características acima relatadas fazem com que ocorra um fenômeno no Brasil de substituição de espécies de escorpiões autóctones pelo *T.serrulatus*, através de competição. Isso vem sendo observado na região de Brasília, onde a espécie endêmica *Tityus fasciolatus* apresentou decaimento nos últimos anos e em São Paulo, onde é denotada a competição do *T.serrulatus* com o escorpião anteriormente dominante da área, *Tityus bahiensis* (Lourenço et al, 1996; Lourenço & Cuellar, 1996). 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).

Acidentes envolvendo *T.serrulatus* vêm sendo reportados também em regiões distantes de seu local de origem, como no Rio Grande do Sul. A grande adaptabilidade e potencial de reprodução dessa espécie fazem com que a introdução acidental de poucos indivíduos em novos ambientes seja suficiente para colonizá-los em um curto espaço de tempo (Torres et al. 2002). Por se tratar de uma espécie essencialmente perigosa ao homem, é necessário que a monitoração constante da expansão dessa espécie, bem como a adoção de medidas para contê-la, sejam realizadas pelas autoridades locais (SUCEN e SES, 2007).

1.2- O veneno: composição e mecanismo de ação

Os venenos escorpiônicos são misturas complexas de substâncias produzidas por glândulas seromucosas e inoculadas por aparato especializado presente no animal peçonhento. A produção de materiais tóxicos 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. Essas misturas apresentam as mais diversas biomoléculas, que se encontram em concentrações variadas. Devido a essa grande diversidade de componentes e o difícil isolamento desses mesmos para caracterização, uma parcela muito pequena das biomoléculas integrantes dos venenos foi devidamente estudada (Gazarian et al, 2005).

No veneno do escorpião *T. serrulatus*, cerca de 380 diferentes massas, possivelmente relacionadas com mais de 300 compostos diferentes, foram identificadas por espectrometria de massas em apenas duas das frações mais tóxicas purificadas por filtração (Pimenta et al. 2001). Das 1500 espécies de escorpião descritas até agora, apenas 30 tiveram seus venenos profundamente estudados. Tomando-se o número total de espécies de escorpião estimadas, pode-se prever mais de 100.000 compostos existentes nos venenos de escorpiões, dos quais apenas 0,02% foram identificados e caracterizados (Possani et al. 2000). Além dessa diversidade estimada, indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar composição diferente de veneno de acordo com o seu tipo de alimentação, idade, habitat e com o momento da inoculação, o que aumenta ainda mais a previsão de compostos a serem estudados (Inceoglu et al, 2003; Kalapothakis & Chavez-Olórtegui, 1997).

Dentre os compostos que já foram identificados como componentes do veneno estão: histamina, serotonina, sais diversos, peptídeos, nucleotídeos, aminoácidos, enzimas, inibidores de enzimas e neurotoxinas (Diniz 1978; Possani et al, 1981). As enzimas proteolíticas presentes podem atuar 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 (Almeida et al. 2002; Pessini et al. 2001). Entretanto as neurotoxinas são as grandes responsáveis pelos principais sintomas apresentados no envenenamento.

As neurotoxinas escorpiônicas são proteínas básicas, de baixo peso molecular, que exercem seus efeitos tóxicos pela 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. Devido à alta especificidade e força da sua interação com os canais iônicos, as neurotoxinas são muito utilizadas como ferramentas para o estudo dos mecanismos de ação

dos canais, sendo de grande importância para o campo da neurofisiologia (Catterall et al, 2007).

As neurotoxinas escorpiônicas são divididas em quatro famílias principais de acordo com o tipo de canal em que atuam: canais de Na^+ , canais de K^+ , canais de Ca^{++} ou canais de Cl^- (Becerril et al, 1997). As toxinas que afetam canais de Na^+ são compostas por 60-70 aminoácidos (aa) e são estabilizadas por 4 pontes dissulfeto. As que afetam canais de K^+ são menores, com 30-40 aa e são estabilizadas por 3 ou 4 pontes dissulfeto (Rodriguez de la Vega & Possani, 2004). Ainda são poucas as toxinas caracterizadas que possuem especificidade para canais de Cl^- . Elas possuem 36 aa e 4 pontes dissulfeto. A clorotoxina, o primeiro membro dessa família a ser identificado e caracterizado, demonstrou se ligar especificamente ao receptor MMP2 associado a canais de Cl^- , 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). Todas as toxinas pertencentes aos grupos acima mencionados apresentam organização tridimensional semelhante sendo formada por 1 α -hélice e 3 folhas- β interconectados por loops de tamanho e composição variados (Fig 4). As toxinas para canais de Ca^{++} 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).

No veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, a maior parte das neurotoxinas estudadas foram identificadas como sendo específicas para canais de K^+ e Na^+ , sendo que essas últimas são tidas como as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno.

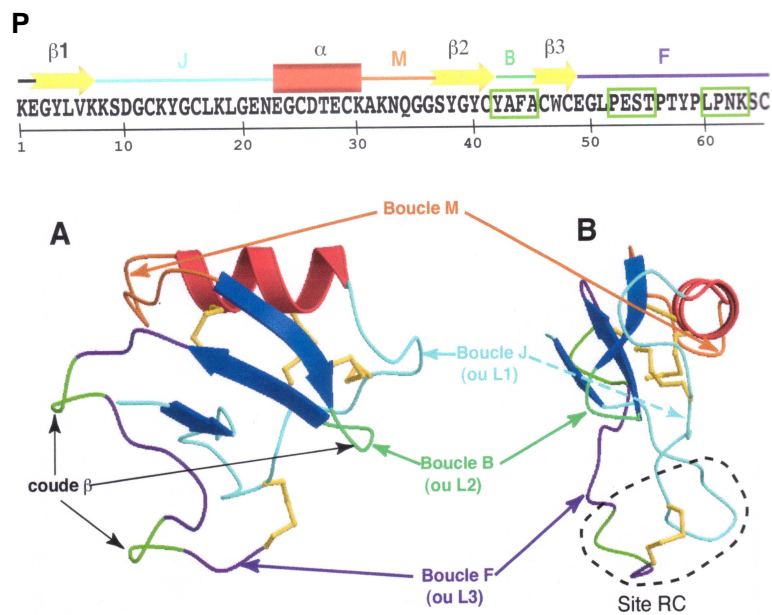


Figura 4: Estrutura primária (P) de uma β -toxina, e seu arranjo conformacional (A e B). Estão destacados, tanto na seqüência primária quanto na estrutura conformacional, as estruturas secundárias e o sítio de interação com o canal de sódio (RC).

As toxinas que afetam canais de Na^+ são subdivididas em toxinas do tipo α e toxinas do tipo β , de acordo com o sítio com o qual interagem no canal. As toxinas do tipo α interagem com o sítio 3, de maneira voltagem dependente, e retardam o tempo do fechamento da comporta de inativação do canal (Catterall, 2007). Elas estão representadas no veneno de *T.serrulatus* pela Ts IV (Martin-Eauclaire et al, 1994). Já as toxinas do tipo β se ligam no sítio 4 do canal independentemente da voltagem e aumentam a sensibilidade do canal à ela, fazendo com que esse se abra mais rapidamente. O veneno de *T.serrulatus* conta com dois representantes dessa classe já caracterizados, TsII (Mansuelle et al, 1992) e TsVII (Bechis et al. 1984). A ação sinérgica das toxinas α e β faz com que o canal de Na^+ fique aberto por mais tempo, prolongando assim o potencial de ação.

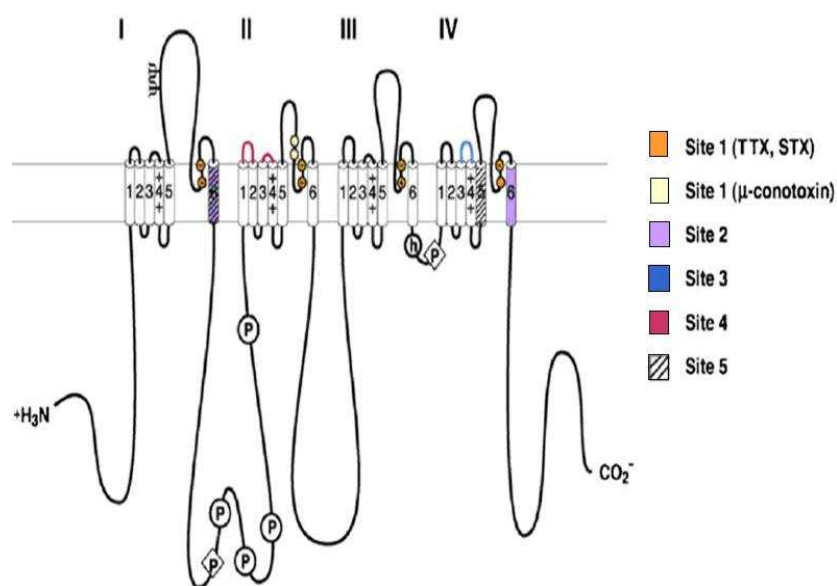


Figura 5: Desenho esquemático do canal de sódio. São destacados os seus principais sítios de interação (Catterall et al. 2007).

As toxinas específicas para canais de K^+ também estão presentes no veneno de *T.serrulatus*. Entretanto, por não apresentarem efeitos tóxicos significativos (apenas 9,2% da toxicidade com relação às toxinas para canais de Na^+), o seu estudo foi negligenciado. Devido ao fato anteriormente mencionado das neurotoxinas serem importantes ferramentas para o estudo de canais, as toxinas para canais de K^+ estão novamente ganhando a atenção dos pesquisadores. Essas toxinas atuam como bloqueadores dos canais de K^+ , impedindo a repolarização da membrana para a terminação do potencial de ação (Rodriguez de la Vega & Possani, 2004). Cerca de 120 toxinas escorpionicas para canais de K^+ já foram caracterizadas, entretanto a TsTX-IV é o único representante caracterizado em *T.serrulatus* (Novello et al. 1999).

1.3- Implicações médicas

Devido á alta toxicidade do veneno, o encontro acidental do escorpião com o homem pode levar a quadros clínicos graves. O tipo de sintomatologia desenvolvida no envenenamento é semelhante para diferentes espécies de escorpião, variando a sua intensidade.

No Brasil, aproximadamente 10.000 casos de escorpionismo são notificados e tratados nos centros médicos anualmente (Cardoso et al. 1995). O *T. serrulatus*, a espécie mais prevalente no país, é responsável pela maioria dos acidentes. Metade desses casos ocorre em Minas Gerais, com destaque para a região de Belo Horizonte, cidade que foi construída sobre solo propício aos escorpiões, sendo os acidentes freqüentes (Soares et al. 2002). Apesar de em geral o prognóstico para o envenenamento ser favorável, cerca de 1,1% dos casos evoluem para o óbito. É importante ressaltar que o estudo da epidemiologia dos envenenamentos é altamente negligenciado, sendo praticamente impossível contar com dados precisos de números de acidentes e mortalidade. Além disso, vários casos de escorpionismo não chegam a ser registrados, por ocorrerem em regiões ermas, onde o atendimento médico muitas vezes não é disponível ou por falta de esclarecimento da população de procurar um centro médico para o tratamento da picada (Theakston et al. 2003). Devido a isso, o número de acidentes e óbitos reais pode ser muito maior do que o estimado.

A maior parte dos sintomas do envenenamento (Tab. 1) são efeitos resultantes 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 Jr et al, 2001).

O desenvolvimento de uma sintomatologia mais branda ou mais severa em um acidente escorpiônico depende diretamente da quantidade de veneno inoculada pelo escorpião e também de características da vítima, como sexo,

status imunológico, contatos anteriores e idade, sendo que crianças e idosos apresentam maior risco de virem a desenvolver um quadro clínico grave (Padilla et al. 2003; Soares et al. 2002).

Tabela 1: Manifestações clínicas mais freqüentes nos acidentes escorpionicos.

CLASSIFICAÇÃO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	SOROTERAPIA (nº de ampolas)
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.	2 a 3
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.	4 a 6 ***

Fonte: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos – Ministério da Saúde

A insuficiência cardíaca e o edema pulmonar são os principais responsáveis pela morte decorrente do envenenamento por escorpião.

Além da sintomatologia 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).

1.4- O soro antiescorpiônico

A medida terapêutica mais aceita para sanar os efeitos tóxicos do veneno de escorpião é o tratamento com o soro antiescorpiônico. A eficácia do tratamento com o soro está associada com a rapidez com que este é iniciado, com a qualidade do soro utilizado e com a dosagem e via de administração (Gazarian et al, 2005; Hamed 2003; Krifi et al. 2005; Rezende et al. 1995). 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* a 0,03%. Na Turquia, a imunoterapia reduziu a mortalidade relacionada a acidentes escorpiônicos de 8% para níveis menores do que 0,05% e também reduziu o período de internação hospitalar das vítimas de envenenamento.

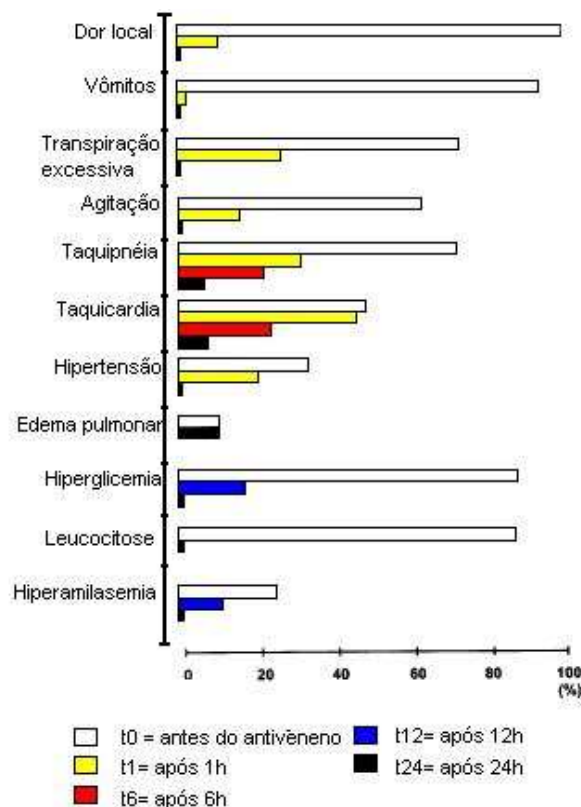


Figura 6: Gráfico demonstrando a reversão dos sintomas do envenenamento pelo tratamento com soro antiescorpiônico.

Algumas reações adversas podem surgir em decorrência do tratamento com imunoterápicos, como a anafilaxia e a doença do soro. Essas reações ocorrem pelo contato com proteínas alergênicas não próprias ou pela formação de uma resposta imunológica secundária em caso de sensibilização prévia; e pela deposição de imunocomplexos respectivamente (Chippaux & Goyffon, 1998). Para reverter essa situação, estão sendo tomadas medidas tanto na área médica, com o tratamento prévio com anti-histamínicos dos pacientes que venham a receber o soro (Fukuhara et al. 2003), quanto no setor de produção, com a melhoria do processo de purificação do soro e clivagem das imunoglobulinas. Esse processo consiste em digerir a molécula de anticorpo com papaína ou pepsina para a retirada da porção Fc, responsável por grande parte desses efeitos colaterais apresentados.

Apesar do grande êxito alcançado pela imunoterapia, alguns grupos questionam a sua validade, sendo favoráveis à adoção de um tratamento visando à reversão dos sintomas utilizando drogas específicas para os tais (Hamed, 2003). Entretanto, como o mecanismo de ação do veneno ainda não é totalmente entendido, o uso de drogas para o tratamento se torna empírico, o que pode vir a gerar problemas (Ismail, 1995).

A produção de antisoros já é feita a mais de 100 anos no Brasil. Ela se dá pela hiperimunização de cavalos com o veneno total de uma ou mais espécies de escorpião (Barrio & Vital-Brasil, 1949). A imunização com o veneno bruto é capaz de gerar um soro adequado ao tratamento. Entretanto, devido à alta toxicidade deste imunógeno, o animal produtor 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). Devido à debilitação do animal, a potência do soro produzido também é limitada, uma vez que uma dosagem elevada ou um protocolo intenso de imunização não é suportado (Machado de Ávila et al. 2004).

Ao longo de todos esses anos, pouco foi alterado no processo de produção do antisoro. Em 2001, foi realizado um encontro mundial, promovido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), para discutir a padronização e

controle da produção dos antivenenos e problemas relacionados a ela. Foi consensado 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).

Para contornar o problema da toxicidade do veneno para a produção do anti-soro, vários imunógenos alternativos vêm sendo propostos pelos grupos de pesquisa, como o veneno detoxificado pela interligação de seus componentes (Machado de Ávila et al, 2004; Kharrat et al. 1997), encapsulação do veneno em lipossomas (Chavez-Olortegui et al. 1991), o uso de peptídeos sintéticos (Alvarenga et al. 2002, Calderon-Aranda et al. 1995; Devaux et al. 1997; Maria et al. 2005; Shinnick et al. 1983) e anatoxinas naturais imunogênicas, que vem sendo identificadas no veneno de vários escorpiões (Chavez-Olortegui et al. 1996; Martin-Eauclaire et al. 2006; Srairi-Abid et al. 2000). O fato de serem necessárias grandes quantidades de veneno para a produção em larga escala e para os testes de controle de qualidade também constitui um problema, já que este nem sempre se encontra facilmente disponível.

Peptídeos sintéticos são uma boa alternativa para a produção de antivenenos, por não serem tóxicos e por poderem ser produzidos em grandes quantidades. Um estudo imunoquímico aprofundado para identificação da seqüência mais eficiente é requerido para que esta abordagem obtenha sucesso (Calderon-Aranda et al. 1995; Ozkan et al. 2006; Zenouaki et al. 1997).

Além da melhoria na produção do soro antiescorpiônico, vários grupos indicam a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina antiescorpiônica (Calderon-Aranda et al. 1995; Chippaux & Goyffon, 1998; Gazarian et al. 2005). Esta seria importante para áreas onde há grande prevalência de acidentes escorpiônicos, mas que não contam com centros médicos próximos para

tratamento. Além disso, o conhecimento produzido nesse tipo de pesquisa é de grande valor e deve, portanto, ser estimulado.

A produção de anticorpos monoclonais contra as toxinas escorpiônicas também foi aventada, tanto para o seu uso terapêutico, como para o uso em estudos imunológicos. Estes são de difícil obtenção, uma vez que os protocolos de imunização são complicados pela alta toxicidade e baixa imunogenicidade geral das toxinas (Alvarenga et al. 2005; Clot-Faybesse et al. 1999; Devaux et al. 2002).

1.5- TsNTxP

A TsNTxP (*Tityus serrulatus* non-toxic protein) é uma anatoxina natural presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, identificada por Chávez-Olórtegui em 1996 (Chavez-Olórtegui et al. 1996) a partir de duas cromatografias subsequentes: filtração molecular e troca iônica. A TsNTxP é uma proteína básica composta por 63 resíduos de aminoácidos, que lhe confere peso molecular de 6.8 kDa. Quando comparada com três das principais toxinas de *T. serrulatus* apresenta alto grau de similaridade. Exibe 65% de homologia com a Ts VII (Bechis et al. 1984; Possani et al. 1985) e 45% com TsIV (Diniz, 1978; Possani et al, 1985; Martin-Eauclaire et al. 1994).

Além de não apresentar toxicidade em mamíferos, mesmo quando injetada em altas doses, a TsNTxP é capaz de fomentar a produção de anticorpos que possuem capacidade neutralizante em relação aos efeitos tóxicos e letais do veneno total (Chavez-Olórtegui et al. 1997). Os anticorpos anti-TsNTxP, além de reconhecerem propriamente o veneno total de *T. serrulatus* e sua fração tóxica em ELISA, apresentam ligação moderada ao veneno de, *T. cambridgei* e *T. stigmurus*. Além disso, se ligam de maneira detectável à TsIV e à TsVII, respectivamente α e β toxinas do veneno. Quantidades equivalentes a 20 LD₅₀ do veneno total de *T. serrulatus* foram efetivamente neutralizadas por 1 ml do soro anti-TsNTxP. Essas características peculiares levaram ao estudo sistemático dessa proteína desde então (Moreira-Ferreira et al. 1998).

O gene da TsNTxP foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno do escorpião utilizando-se anticorpos anti-TsNTxP (Guatimosim et al. 1999). A sua seqüência nucleotídica foi obtida e revelou a presença de um íntron dentro da região codificadora para o peptídeo sinal. A seqüência nucleotídica da TsNTxP demonstrou alto grau de similaridade com as seqüências das neurotoxinas de *T.serrulatus*. O gene isolado 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. A disponibilidade de uma construção recombinante da TsNTxP é interessante, uma vez que ela se torna passível de ser produzida em larga escala para um eventual uso como imunógeno na produção de soros.

O mapeamento de regiões epitópicas lineares da TsNTxP foi realizado em 2002, através da metodologia de SPOT (Alvarenga et al. 2002), que analisa a reatividade de peptídeos individuais imobilizados em membranas de celulose contendo seqüências que se sobrepõem, cobrindo assim toda a seqüência da proteína estudada. Foram construídos peptídeos sobrepostos contendo 15 resíduos cobrindo toda a seqüência da TsNTxP. 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 TsIV foram sintetizados, acoplados ao KLH e utilizados como imunógenos. O soro produzido por estes peptídeos foi capaz de neutralizar 13.5 LD₅₀ por ml. Esse soro também apresentou reatividade cruzada 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 classe específica e toxinas de outras classes (De Lima et al. 1993). Portanto, quando a TsNTxP 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. 2002). 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, Tir 5, Asp 8, Asp 50, Trp 55 and Lis 61). Apenas um único resíduo (Glu 58) demonstrou ser exclusivo da TsNTxP.

Foi modelada a estrutura tridimensional da TsNTxP e os resíduos identificados como antigenicamente importantes se mostraram expostos na superfície da moléculas, sendo 5 deles agrupados na região dada como sítio ativo de ligação ao canal da proteína. Esses resíduos também se mostraram 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.

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).

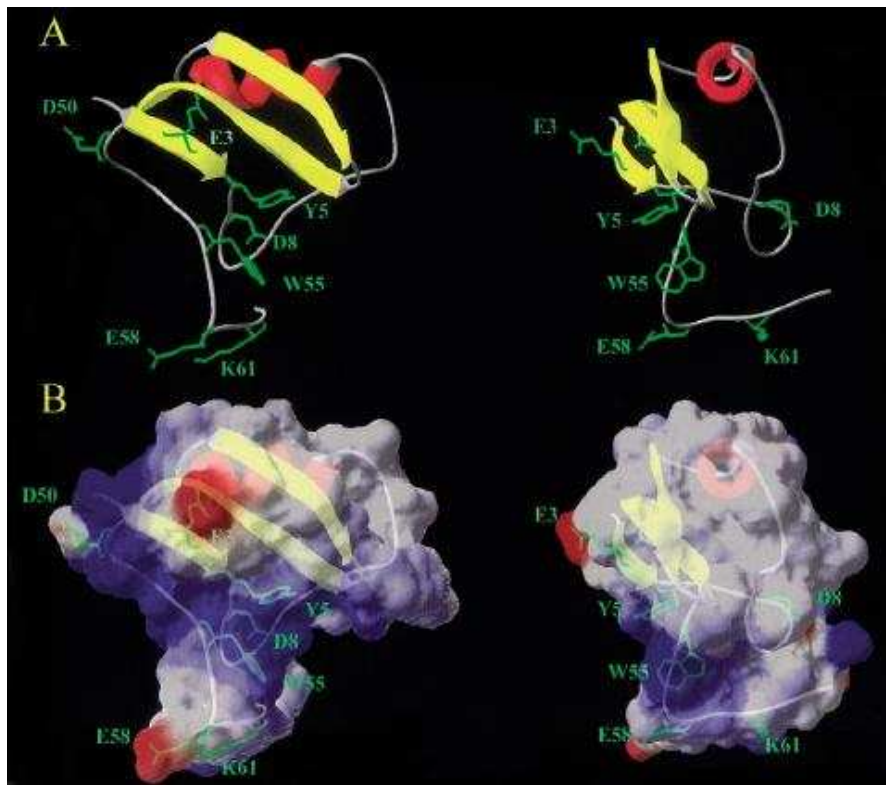


Figura 7: Estrutura tridimensional da TsNTxP prevista por modelagem. Em A estão mostrados os resíduos identificados como importantes para a antigenicidade da molécula. Em B é mostrado o potencial eletrostático e a acessibilidade da superfície da TsNTxP. Regiões positivas são mostradas em azul e regiões negativas em vermelho (Chavez-Olortegui et al. 2002).

1.6- Mapeamento de epitopos

Epitopo é o sítio específico do antígeno reconhecido pelo sistema imunológico capaz de despertar uma resposta. Cada antígeno pode conter várias regiões que apresentam essa característica epitópica. Epitopos podem ser segmentos contínuos na seqüência primária da proteína, os chamados epitopos lineares, ou serem compostos por uma região na superfície tridimensional da proteína, os chamados epitopos conformacionais.

Os epitopos conformacionais consistem em 2 ou mais regiões que se encontram separadas na seqüência linear do antígeno, mas que são aproximadas pelo enovelamento da proteína, sendo reconhecidas em conjunto pelo anticorpo. É importante ressaltar que estes epitopos descontínuos podem

conter alguns pequenos segmentos contínuos (Van Regenmortel, 1996). Grande parte da resposta imune mediada por células B produz anticorpos que reconhecem as proteínas inteiras na sua conformação nativa, uma vez que o antígeno não sofre o processamento complexo pelo qual passam os antígenos apresentados às células T. Sendo assim, os epitopos conformacionais surgem como os principais determinantes da resposta imune humoral (Janeway, 5ª ed, 2001).

O desenvolvimento das tecnologias experimentais permitiu a identificação dos epitopos importantes em uma resposta imune, o chamado mapeamento. O conhecimento de tais regiões é importante para o entendimento das bases moleculares da imunogenicidade e pode ser utilizado para a geração de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.

O método mais informativo e acurado para a identificação de epitopos conformacionais é a determinação da estrutura tridimensional do complexo antígeno-anticorpo por cristalografia de raio-x. Entretanto, esta é uma técnica complexa e laboriosa, além da obtenção de um cristal de qualidade para este complexo é complicada pela flexibilidade inerente à ligação antígeno-anticorpo, onde ambas as moléculas sofrem alterações conformacionais particulares no momento da interação (Colman et al. 1987; Lescar et al. 1993).

Apesar da predominância desse tipo de epitopo, são poucas as outras técnicas desenvolvidas para a sua identificação precisa e conseqüentemente os trabalhos considerando esse tipo de abordagem são menos numerosos. Dentre essas poucas técnicas existentes para a identificação de epitopos descontínuos, a maioria se baseia em abordagens computacionais, sendo as técnicas realmente experimentais ainda mais escassas (Haste et al, 2006; Rapberger et al. 2007; Van Regenmortel, 2001).

O método de SPOT é uma ferramenta para estudos de interação que se baseia na síntese paralela de peptídeos em membranas de celulose (Frank, 1992). 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) (Fig.8). 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 dessa forma. Como uma mesma membrana pode abrigar diversos spots individualizados, seqüências peptídicas diferentes podem ser sintetizadas em uma pequena área. Para a detecção da reação ou interação que se deseja avaliar por esse método, pode-se utilizar qualquer sistema repórter já estabelecido para outras técnicas, como ELISA ou Western blot, uma vez que o sinal estará limitado ao sítio ou spot no qual a espécie reativa foi sintetizada, sendo possível assim 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 foi automatizada, permitindo a síntese eficiente de centenas de peptídeos em uma mesma membrana, sendo possível gerar dados em larga escala (Fig. 9). Essa técnica é flexível e pode ser empregada nos mais variados estudos. Dentre esses podemos citar a avaliação de atividade proteásica e quinásica medidas pela alteração de um substrato ligado à membrana de celulose; a ligação de DNA ou metais á peptídeos imobilizados; e o estudo de mapeamento de epitopos lineares, a primeira aplicação dessa técnica e até hoje a mais utilizada (Wenschuh et al. 2000).

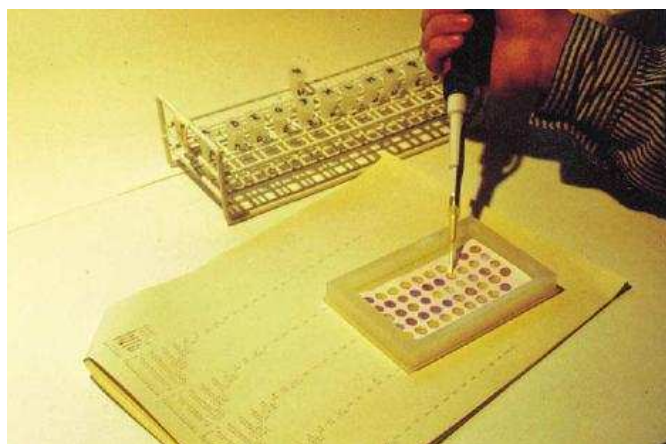


Figura 8: Síntese de uma membrana pelo método de SPOT. Cada pequena região circular pode conter uma espécie molecular diferente (Frank, 2002).

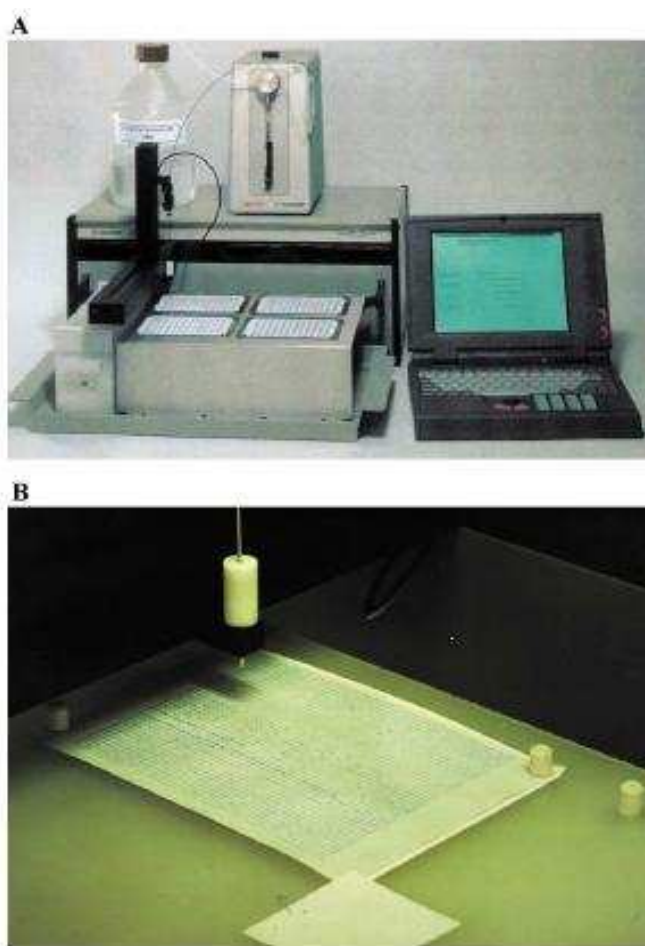


Figura 9: Robô ASP222, desenvolvido para a síntese de SPOT (Frank, 2002).

Para o estudo de interações de epitopos descontínuos, uma adaptação da tecnologia de SPOT foi desenvolvida por Reineke et al. 2000, construindo-se peptídeos que mimetizem essas regiões a partir da combinação de dois fragmentos independentes. Para a síntese de um epitopo descontínuo, é necessário que as partes que contribuem para sua formação estejam presentes na conformação corretas e ligadas entre si. A ligação entre elas deve ser feita por uma seqüência espaçadora que não interfira nas propriedades individuais de cada um dos segmentos (Reineke et al. 1999). Apesar da facilidade e conveniência dessa técnica, poucos exemplos de mapeamento de sítios descontínuos de interação entre proteína-proteína utilizando o método de SPOT foram reportados até o momento (Frank, 2002).

Tendo em vista o grave problema do escorpionismo no Brasil, especialmente em Minas Gerais, o estudo imunológico do veneno de *Tityus serrulatus* tem se mostrado importante para o melhor entendimento do seu mecanismo de ação e para o desenvolvimento de imunoterápicos mais eficientes e de melhor qualidade. Nesse sentido, o trabalho aqui apresentado contribui com um estudo de mapeamento de possíveis epitopos descontínuos da TsNTxP através da técnica de SPOT modificada acima apresentada. Essa proteína é uma anatoxina capaz de gerar anticorpos que neutralizam a fração tóxica do veneno desse escorpião e tem, portanto grande potencial para o uso no desenvolvimento de antivenenos e vacinas.

2-OBJETIVOS

2.1- Geral

- Identificar, sintetizar e caracterizar epitopos descontínuos da TsNTxP, uma anatoxina natural presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, na tentativa de induzir anticorpos protetores por imunização de animais com peptídeos sintéticos.

2.2- Específicos

-Mapear regiões antigênicas (epitopos) descontínuas da TsNTxP pelo método de SPOT.

-Sintetizar os peptídeos correspondentes aos epitopos descontínuos identificados por síntese química manual.

- Produzir imunógenos a partir dos peptídeos sintetizados e de uma proteína carradora (ovalbumina) e a partir da polimerização do próprio peptídeo.

- Imunizar camundongos e coelhos com os imunógenos produzidos.

- Verificar a produção de anticorpos específicos contra os imunógenos através de ensaios de ELISA e SPOT.

- Testar a capacidade neutralizante de anticorpos específicos produzidos dos efeitos tóxicas e letais do *T. serrulatus* através de ensaios de neutralização *in vivo* e *in vitro*.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais e venenos

Os camundongos utilizados foram fêmeas da linhagem Balb/c. No programa de imunização, os animais foram determinados por idade (8 semanas) e para os ensaios de toxicidade foram determinados por peso (20g). Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo, ICB-UFMG e receberam água e ração sob condições ambientais controladas.

Foram utilizadas quatro coelhas fêmeas da raça New Zealand (2 kg), compradas da Fazenda da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG e mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, recebendo água e ração sob condições ambientais controladas.

Escorpiões adultos da espécie *Tityus serrulatus* foram coletados na região de Belo Horizonte e mantidos na Seção de Animais Peçonhentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O veneno bruto foi obtido por estimulação elétrica dos telsons e estocado á -20°C no escuro a té o uso.

3.2- Método de SPOT

3.2.1- Síntese de peptídeos em membrana de celulose (SPOT synthesis)

Peptídeos sobrepostos cobrindo toda a seqüência da TsNTxP foram montados sobre uma membrana de celulose (Abimed - Langenfield, Alemanha). Na tentativa de mimetizar possíveis epitopos conformacionais, foram sintetizados peptídeos descontínuos, compostos por uma seqüência contínua de oito resíduos da porção N-terminal, uma espaçador contendo duas glicinas e mais uma seqüência contínua de 8 resíduos da porção C-terminal. Para cobrir toda a seqüência da proteína, foram sintetizados peptídeos cuja seqüência apresentou sobreposição de dois aminoácidos com a seqüência anterior. Combinando-se todas as seqüências possíveis a partir da porção N-

terminal com todas as seqüências possíveis a partir do C-terminal, foram obtidos 153 peptídeos diferentes (Tab. 2).

Tabela 2: Seqüências dos peptídeos descontínuos da TsNTxP sintetizados em membrana de celulose.

Seqüência da TsNTxP	
GREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSETNKCG	
1(C) GREGYPADGGASASASAS	
2. GREGYPADGG	TSETNKCG
3. GREGYPADGG	KIWTSETN
4. GREGYPADGG	DSVKIWTS
5. GREGYPADGG	GLPDSVKI
6. GREGYPADGG	YCYGLPDS
7. GREGYPADGG	PACYCYGL
8. GREGYPADGG	CAWPACYC
9. GREGYPADGG	SGYCAWPA
10. GREGYPADGG	KGSSGYCA
11. GREGYPADGG	TLKKGSSG
12. GREGYPADGG	TECTLKKG
13. GREGYPADGG	YCNTECTL
14. GREGYPADGG	AAGYCNTE
15. GREGYPADGG	FLTAAGYC
16. GREGYPADGG	ITCFLTAA
17. GREGYPADGGGCKITCFL	
18. GYPADSKGGASASASAS	
19. GYPADSKGG	TSETNKCG
20. GYPADSKGG	KIWTSETN
21. GYPADSKGG	DSVKIWTS
22. GYPADSKGG	GLPDSVKI
23. GYPADSKGG	YCYGLPDS
24. GYPADSKGG	PACYCYGL
25. GYPADSKGG	CAWPACYC
26. GYPADSKGG	SGYCAWPA
27. GYPADSKGG	KGSSGYCA
28. GYPADSKGG	TLKKGSSG
29. GYPADSKGG	TECTLKKG
30. GYPADSKGG	YCNTECTL
31. GYPADSKGG	AAGYCNTE
32. GYPADSKGG	FLTAAGYC
33. GYPADSKGGITCFLTAA	
34(C) ADSKGCKI GGASASASAS	
35. ADSKGCKI GG	TSETNKCG
36. ADSKGCKI GG	KIWTSETN
37. ADSKGCKI GG	DSVKIWTS
38. ADSKGCKI GG	GLPDSVKI
39. ADSKGCKI GG	YCYGLPDS
40. ADSKGCKI GG	PACYCYGL
41. ADSKGCKI GG	CAWPACYC
42. ADSKGCKI GG	SGYCAWPA
43. ADSKGCKI GG	KGSSGYCA
44. ADSKGCKI GG	TLKKGSSG
45. ADSKGCKI GG	TECTLKKG
46. ADSKGCKI GG	YCNTECTL
47. ADSKGCKI GG	AAGYCNTE
48. ADSKGCKI GGFLTAAGYC	
49(C) KGCKITCFGGASASASAS	
50. KGCKITCFGG	TSETNKCG
51. KGCKITCFGG	KIWTSETN
52. KGCKITCFGG	DSVKIWTS
53. KGCKITCFGG	GLPDSVKI
54. KGCKITCFGG	YCYGLPDS
55. KGCKITCFGG	PACYCYGL
56. KGCKITCFGG	CAWPACYC
57. KGCKITCFGG	SGYCAWPA
58. KGCKITCFGG	KGSSGYCA
59. KGCKITCFGG	TLKKGSSG
60. KGCKITCFGG	TECTLKKG
61. KGCKITCFGG	YCNTECTL
62. KGCKITCFGGAAGYCNTE	
63(C) KITCFLTAGGASASASAS	
64. KITCFLTAGG	TSETNKCG
65. KITCFLTAGG	KIWTSETN
66. KITCFLTAGG	DSVKIWTS
67. KITCFLTAGG	GLPDSVKI
68. KITCFLTAGG	YCYGLPDS
69. KITCFLTAGG	PACYCYGL
70. KITCFLTAGG	CAWPACYC
71. KITCFLTAGG	SGYCAWPA
72. KITCFLTAGG	KGSSGYCA
73. KITCFLTAGG	TLKKGSSG
74. KITCFLTAGG	TECTLKKG
75. KITCFLTAGGYCNTECTL	
76(C) CFLTAAGYGGASASASAS	
77. CFLTAAGYGG	TSETNKCG
78. CFLTAAGYGG	KIWTSETN
79. CFLTAAGYGG	DSVKIWTS
80. CFLTAAGYGG	GLPDSVKI
81. CFLTAAGYGG	YCYGLPDS
82. CFLTAAGYGG	PACYCYGL
83. CFLTAAGYGG	CAWPACYC
84. CFLTAAGYGG	SGYCAWPA
85. CFLTAAGYGG	KGSSGYCA
86. CFLTAAGYGG	TLKKGSSG
87. CFLTAAGYGGTECTLKKG	
88(C) TAAGYCNTEGGASASASAS	
89. TAAGYCNTEGG	TSETNKCG
90. TAAGYCNTEGG	KIWTSETN
91. TAAGYCNTEGG	DSVKIWTS
92. TAAGYCNTEGG	GLPDSVKI
93. TAAGYCNTEGG	YCYGLPDS
94. TAAGYCNTEGG	PACYCYGL
95. TAAGYCNTEGG	CAWPACYC
96. TAAGYCNTEGG	SGYCAWPA
97. TAAGYCNTEGG	KGSSGYCA
98. TAAGYCNTEGGTLKKGSSG	
99(C) GYCNTECTGGASASASAS	
100. GYCNTECTGG	TSETNKCG
101. GYCNTECTGG	KIWTSETN
102. GYCNTECTGG	DSVKIWTS
103. GYCNTECTGG	GLPDSVKI
104. GYCNTECTGG	YCYGLPDS
105. GYCNTECTGG	PACYCYGL
106. GYCNTECTGG	CAWPACYC
107. GYCNTECTGG	SGYCAWPA
108. GYCNTECTGGKGSSGYCA	
109(C) NTECTLKKGGASASASAS	
110. NTECTLKKGG	TSETNKCG
111. NTECTLKKGG	KIWTSETN
112. NTECTLKKGG	DSVKIWTS
113. NTECTLKKGG	GLPDSVKI
114. NTECTLKKGG	YCYGLPDS
115. NTECTLKKGG	PACYCYGL
116. NTECTLKKGG	CAWPACYC
117. NTECTLKKGGSGYCAWPA	
118(C) CTLKKGSSGGASASASAS	
119. CTLKKGSSGG	TSETNKCG
120. CTLKKGSSGG	KIWTSETN
121. CTLKKGSSGG	DSVKIWTS
122. CTLKKGSSGG	GLPDSVKI
123. CTLKKGSSGG	YCYGLPDS
124. CTLKKGSSGG	PACYCYGL
125. CTLKKGSSGGCAWPACYC	
126(C) KKGSSGYCGGASASASAS	
127. KKGSSGYCGG	TSETNKCG
128. KKGSSGYCGG	KIWTSETN
129. KKGSSGYCGG	DSVKIWTS
130. KKGSSGYCGG	GLPDSVKI
131. KKGSSGYCGG	YCYGLPDS
132. KKGSSGYCGGPACYCYGL	
133(C) SSGYCAWPGGASASASAS	
134. SSGYCAWPGG	TSETNKCG
135. SSGYCAWPGG	KIWTSETN
136. SSGYCAWPGG	DSVKIWTS
137. SSGYCAWPGG	GLPDSVKI
138. SSGYCAWPGGYCYGLPDS	
139(C) YCAWPACYGGASASASAS	
140. YCAWPACYGG	TSETNKCG
141. YCAWPACYGG	KIWTSETN
142. YCAWPACYGG	DSVKIWTS
143. YCAWPACYGGGLPDSVKI	
144(C) WPACYCYGGGASASASAS	
145. WPACYCYGGG	TSETNKCG
146. WPACYCYGGG	KIWTSETN
147. WPACYCYGGGDSVKIWTS	
148(C) CYCYGLPDGGASASASAS	
149. CYCYGLPDGG	TSETNKCG
150. CYCYGLPDGGKIWTSETN	
151(C) YGLPDSVKGASASASAS	

A membrana de celulose foi preparada de acordo com o protocolo descrito por Laune et al. 2002. Os aminoácidos (Novabiochem) foram depositados em volume mínimo (0,6 µl) com auxílio de um micropipetador automático (Abimed Spot Synthesis–ASP222, Langenfeld, Alemanha), permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto.

Inicialmente, a membrana de celulose foi transformada em um suporte que contenha grupamentos amino, para que os aminoácidos possam se ligar. Isso é obtido pela esterificação de uma F-moc-βAla-OH às funções hidroxila disponíveis na celulose (Frank, 1992). Além de tornar o suporte funcional, a adição de um grupamento entre o suporte e o peptídeo a ser sintetizado tem como objetivo afastar o peptídeo do suporte para conferir melhor estabilidade na ligação do peptídeo à membrana.

A síntese do peptídeo iniciou-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido da seqüência estabelecida. Após desproteção do grupo ligado ao Fmoc pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF), as funções aminas foram recuperadas e puderam então reagir com o aminoácido a ser acoplado. A eficiência deste passo pode ser monitorada pela reação com o azul de bromofenol, que apresenta coloração azul quando em contato com grupamentos amino livres.

Os aminoácidos foram em seguida ativados por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida / hidroxibenzotriazol) e depositados, sendo que estes ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento. As reações de ligação foram monitoradas por mudança de coloração dos spots, passando da cor azul ao verde-amarelado devido à reação de azul de bromofenol, denotando a ausência de aminas livres e, portanto, confirmando o acoplamento. As funções NH₂ livres ou que não reagiram foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF a fim de evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados, gerando seqüências erradas, ou outras ligações indesejáveis. O grupo protetor Fmoc do próximo aminoácido foi novamente eliminado em meio básico pela piperidina e a ligação foi verificada

pela coloração com azul de bromofenol. Efetuaram-se lavagens da membrana com metanol e após secagem esta membrana foi posicionada no sintetizador para outro ciclo. O acompanhamento se fez necessário durante todo o processo para verificar se a síntese prosseguiu corretamente. Os procedimentos para o acoplamento de cada aminoácido são realizados em média em 1 h e 15 min. Pelo método de SPOT, o tamanho do peptídeo sintetizado é limitado pelo rendimento, que é ótimo até a faixa de 15-20 aminoácidos. Ao final da síntese, os grupos laterais dos aminoácidos foram desprotegidos pelo tratamento da membrana com ácido trifluoracético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano. Como resultado, é obtida uma membrana de celulose contendo os peptídeos desejados covalentemente ligados á ela em regiões pré-determinadas.

3.2.2- Imunoensaio de SPOT

As membranas contendo os peptídeos sintéticos foram lavadas três vezes, com TBS (Salina, KCl 0.002M, Tris 0,05M) pH 7.4, e então saturadas em solução contendo 335 µl de tampão de bloqueio (Genosys, França) e 0,5g de sacarose em tampão TBS – Tween 0,1% overnight. A membrana foi lavada em tampão TBS - Tween 0,1% e incubada com o soro a ser testado em concentração de 1:100 durante 1h e 30 min á temperatura ambiente sob agitação constante. A membrana foi novamente lavada em tampão e incubada com o anticorpo secundário ligado á fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:2500 por 1h. 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 os spots reativos com o soro testado foram detectados por método de colorimetria direta. A membrana foi scaneada e a intensidade da coloração quantificada pelo software NIH Imager. As intensidades foram calculadas tendo como referência um spot tido como máximo e os demais são calculados em um escala arbitrária.

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). Este procedimento de regeneração permite o uso de uma mesma membrana por 30-40 vezes para anticorpos policlonais e até 70 vezes para anticorpos monoclonais (Frank, 1992).

3.3- Modelagem molecular

A localização do peptídeo foi analisada na estrutura tridimensional da TsNTxP. O modelo tridimensional da TsNTxP foi obtido por modelagem por homologia, utilizando o software MODELLER (Kabsch & Sander, 1993; Sali & Blundell, 1993), como descrito previamente (Chavez-Olortegui et al. 2002), baseando-se na estrutura elucidada da TsVII (Polikarpov et al. 1999).

A análise das proporções da região identificada nos modelos tridimensionais foi feita utilizando-se o programa Swiss PDB Viewer.

3.4- Síntese solúvel de peptídeos

O peptídeo identificado como mais reativo no ensaio de SPOT (GREGYPADGGGLPDSVKI) foi manualmente sintetizado pelo 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 com suporte sólido e os aminoácidos F-moc protegidos foram da Novabiochem. O protocolo utilizado foi semelhante ao utilizado para a síntese em membrana de celulose. Para o monitoramento das desproteções e do acoplamento, entretanto, foi feito o Teste de Kaiser em lugar do teste do Azul de Bromofenol.

O teste de Kaiser consiste em incubar alguns grãos da resina com uma solução contendo ninhidrina, fenol e KCN em piridina por 3 minutos á 100 °C. A coloração azul-arroxeadada denota a presença de aminas livres, enquanto a

coloração amarelada indica que os grupamentos amino se encontram protegidos.

A liberação do peptídeo sintetizado da resina bem como a clivagem dos grupamentos protetores das cadeias laterais também se deu pelo tratamento com TFA, trietilsilano e etanoditiol. Os peptídeos foram então precipitados com éter etílico resfriado, ressuspensos em água e liofilizados. O peptídeo sintetizado foi purificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Shimadzu) utilizando um sistema AKTA e a sua massa confirmada por espectrometria de massa ESI-TOF.

3.5- Imunizações

3.5.1- Preparação do Imunógeno

Os imunógenos foram preparados através do método de ligação cruzada por glutaraldeído em apenas um passo, como previamente descrito (Machado de Ávila 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.

Para o acoplamento com ovalbumina (OVA), foram diluídos em 1 ml de PBS 10 mg do peptídeo e 0,5 mg de OVA. Para a polimerização do peptídeo foram dissolvidas 11 mg deste em 1 ml de PBS.

Ao longo de 1h, 1 ml de uma solução de glutaraldeído 1% foi adicionado à solução peptídeo-OVA e à solução peptídeo-peptídeo, a 4°C e sob constante agitação. A reação se processou por mais uma hora nessas condições e então foi adicionado NaBH_4 em quantidade suficiente para estabelecer uma concentração final de 10 mg/ml, a fim de reduzir as bases livres eventualmente não ligadas pelo glutaraldeído.

Após este passo, as soluções foram dializadas exaustivamente contra PBS e a concentração protéica final de cada uma foi determinada pela absorbância a 280 nm, considerando-se os ϵ molar para resíduos de triptofano ($\epsilon = 5,69$) e tirosina ($\epsilon = 1,28$). Para o imunógeno OVA-peptídeo obteve-se uma concentração final de 8,1 mg/mL, sendo o rendimento igual á 77%, e para o imunógeno peptídeo-peptídeo a concentração final foi de 6,6 mg/mL, sendo o rendimento igual á 60%.

3.5.2- Imunizações

3.5.2.1- Camundongos

Foram divididos três grupos experimentais: OVA-peptídeo (10 animais); peptídeo-peptídeo (10 animais); e controle (20 animais). Cada animal recebeu em cada dose 100 μ g do imunógeno específico emulsificados em 100 μ l de adjuvante de Freund. No grupo controle, o imunógeno foi substituído por igual volume de PBS. Na primeira dose foi utilizado o adjuvante completo em via subcutânea e nas três doses subseqüentes foi utilizado o adjuvante incompleto em via intraperitoneal. O intervalo entre as doses foi de uma semana. Uma semana após a última dose foi feita a sangria dos animais por punção do plexo retro-orbital. Após dois meses foi realizada nova sangria pelo mesmo procedimento. Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante foi coletado e estocado a -4°C.

Ao longo do processo de imunização, morreram 3 animais do grupo controle, 1 animal do grupo OVA-peptídeo e 1 animal do grupo peptídeo-peptídeo, restando assim 17 animais no grupo controle e 9 animais em cada um dos demais grupos.

3.5.2.2- Coelhos

Após coleta do soro pré-imune, dois coelhos foram imunizados com o imunógeno OVA-peptídeo e 2 coelhos com o imunógeno peptídeo-peptídeo. Para cada dose foram injetados 500 μ g de imunógeno, dissolvidos em 1 ml de

PBS e emulsificados em igual volume de adjuvante de Freund. As imunizações foram feitas por via subcutânea, injetando-se 500 µl em 4 pontos diferentes do dorso do animal, para garantir a absorção eficiente. Na primeira dose foi utilizado o adjuvante completo e nas três doses subsequentes foi utilizado o adjuvante incompleto. O intervalo entre as doses foi de 15 dias. O soro imune foi retirado uma semana após a última dose. Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante foi coletado e estocado a -4°C.

3.6- Determinação da LD₅₀

Para a determinação da LD₅₀ foi utilizado o método de Karber em 1937, utilizando-se camundongos Balb/c fêmeas com cerca de 20 g. Estes foram agrupados em 5 grupos de 6 animais que receberam quantidades crescentes de veneno de acordo com um fator pré-estabelecido. A quantidade de veneno injetada no grupo no qual 50% dos animais morreu foi considerada a LD₅₀. Para este estudo, a dose determinada foi de 15 µg de veneno para 20 g de camundongo.

3.7- ELISA

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.) 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 soros a serem testados foram diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20) e dispostos na placa em diluição seriada feita em duplicata. Em seguida, foi adicionado o anticorpo

secundário respectivo (IgG anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo) conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) em diluição de 1:1000. A ligação do anticorpo secundário é 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 em um leitor de ELISA TITERTEK multiscan.

3.8- Ensaios de neutralização

3.8.1- In vivo

Ao final do esquema de imunização, dois camundongos de cada grupo foram injetados com o equivalente a 2.3 LD₅₀ do veneno diluídos em 100µl de PBS-BSA 0,1%. Uma dose maior, equivalente a 2.8 LD₅₀ do veneno foi então testada em mais 4 animais de cada grupo. As doses foram injetadas por via subcutânea. Os animais foram observados por 3h e a mortalidade contabilizada após 48h.

3.8.2- In vitro

A capacidade neutralizante dos soros dos coelhos imunizados foi testada em ensaio de neutralização in vitro. O ensaio consiste em incubar o soro com uma quantidade pré-determinada do veneno a 37°C sob agitação constante durante toda a noite e posteriormente injetar essa mistura em camundongos para avaliar se houve redução da mortalidade e dos efeitos tóxicos do veneno.

Nesse estudo, utilizamos 200 µl do soro de coelhos imunizados com OVA-peptídeo e quantidades de veneno equivalentes a 3 e 1 LD₅₀ , injetados via subcutânea em camundongos Balb/c fêmeas. 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.

4- RESULTADOS

4.1- Identificação de epítopos descontínuos da TsNTxP

4.1.1- Ensaio de SPOT

Para o mapeamento dos epítopos descontínuos foi feito ensaio de SPOT utilizando soro de coelho contendo anticorpos anti-TsNTxP com propriedades neutralizantes pré-determinadas, produzido previamente no laboratório segundo metodologia semelhante á apresentada em Materiais e Métodos.

Como mostra a Fig.10, houve um forte reconhecimento de alguns spots. Após análise de imagens pelo software ImageJ, foram considerados como reativos apenas os spots com intensidade determinada acima de 95. Devido ao estabelecimento desse valor de corte, alguns spots que apresentaram coloração forte, denotando a existência de uma reação específica, não foram considerados nas demais análises, sendo deixados para estudos futuros.

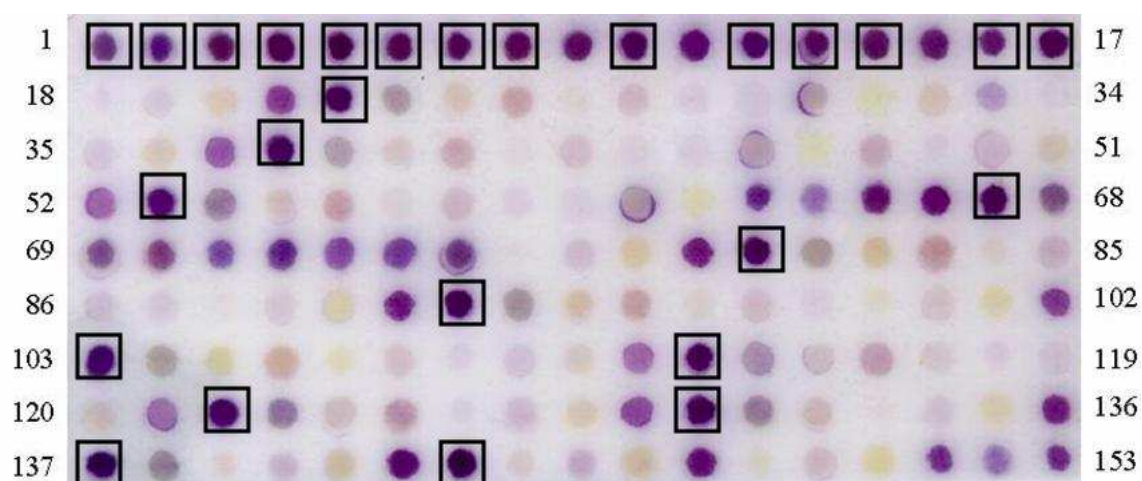


Figura 10: Resultado do imunoenensaio de SPOT modificado para TsNTxP para soro neutralizante anti-TsNTxP de coelho. Membrana contendo seqüências de peptídeos conformacionais da TsNTxP. Os spots destacados são os que apresentaram maior reatividade segundo o programa ImageJ.

Tabela 3: Seqüências dos peptídeos descontínuos reativos identificados por SPOT.

Número do SPOT	Seqüência	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	GYCNTECTGGGLPDSVKI	126
113	NTECTLKKGGGLPDSVKI	96
122	CTLKKGSSGGGLPDSVKI	97
130	KKGSSGYCGGGLPDSVKI	98
137	SSGYCAWPGGGLPDSVKI	113
143	YCAWPACYGGGLPDSVKI	125

A análise das seqüências dos spots determinados como reativos revelou duas porções, GREGYPAD e GLPDSVKI, que apareceram com maior freqüência, sendo que todos os spots identificados contam com pelo menos uma dessas porções em sua seqüência. Coerente com esta observação, o spot que apresentou maior intensidade pela análise de imagens foi o 5, que é composto por ambas as porções (GREGYPADGGGLPDSVKI). Este diepitopo identificado foi escolhido para análises mais refinadas.

4.1.2- Alinhamento da seqüência primária com as principais toxinas

Com o intuito de analisar o diepitopo identificado no contexto da seqüência linear completa da TsNTxP, foi feita sua localização na estrutura primária da proteína, destacando-se os aminoácidos carregados, e o alinhamento com as principais toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*, TsII e TsVII (β -toxinas) e TsIV (α -toxina) (Fig. 11)

O diepitopo mostrou ser composto pela porção N-terminal da proteína e por uma região C-terminal, que se encontram bem distantes uma da outra na estrutura primária.

As regiões que compõem o diepitopo identificado se mostraram conservadas na estrutura primária das toxinas escorpionicas. O alinhamento dessas regiões demonstrou identidade de 50% com TsII, 56% com TsVII, 50% com TsIV e similaridade de 81% com TsII, 75% com TsVII e 69% com TsIV.

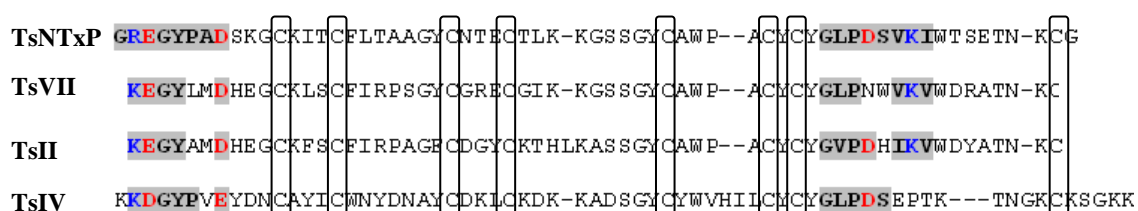


Figura 11: Identificação da região correspondente à seqüência do diepitopo nas estruturas primárias da TsNTxP e das principais toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*. A região destacada em cinza corresponde à região equivalente ao diepitopo. Os resíduos básicos são destacados em azul e os resíduos ácidos em vermelho. O alinhamento foi feito tomando como base a posição das cisteínas.

4.1.3- Modelagem molecular

Como o diepitopo é formado por seqüências que se encontram afastadas na estrutura primária da TsNTxP, é necessário saber se estas se encontram aproximadas na estrutura tridimensional da proteína, para que possam ser considerados como partes de um epitopo conformacional coerente.

Para isso foi feito um modelo da TsNTxP baseando-se na estrutura elucidada da TsVII (Polikarpov et al., 1999) pelo programa MODELLER e as regiões que compõem o diepitopo identificado foram destacadas. A região N-terminal foi destacada em vermelho e a região C-terminal em verde. O diepitopo foi também localizado na estrutura 3D da TsVII, TsII e TsIV, onde também formou uma região semelhante, coerente com a do epitopo da TsNTxP. As porções que não estão ressaltadas em verde ou vermelho dentro da região inicialmente demarcada como pertencente ao diepitopo correspondem a aminoácidos diferentes na estrutura primária das toxinas (Fig. 12).

As regiões N-terminal e C-terminal, distantes na estrutura linear da proteína, se mostraram aproximadas na proteína enovelada. A região do diepitopo também foi dimensionada (Fig.13).

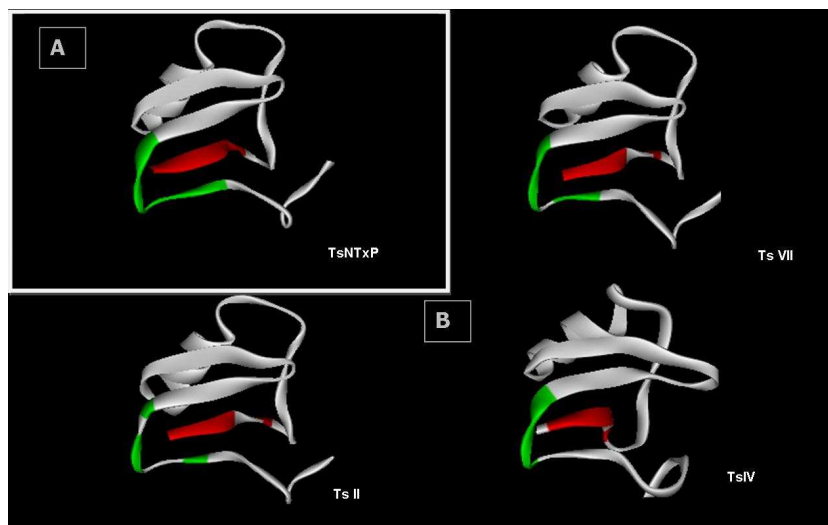


Figura 12: Localização espacial dos epitopos descontínuos na estrutura modelada da TsNTxP e das principais toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*. Estruturas tridimensionais da TsNTxP e das principais toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*. A estrutura da TsVII corresponde á definida por Polikarpov em 1999. As demais toxinas e a TsNTxP foram modeladas pelo programa MODELER tendo como base a estrutura da TsVII. A região destacada em vermelho corresponde a porção N-term (GREGYPAD) e a verde corresponde a região C-term (GLPDSVKI)

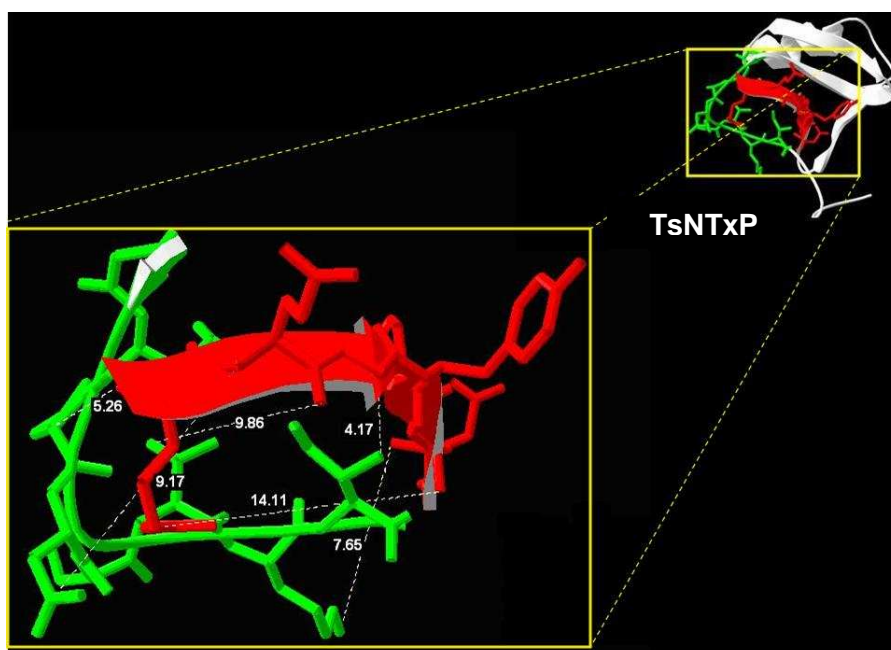


Figura 13: Análise molecular das distâncias (em Å) existentes entre as duas regiões que compõem o diepitopo.

4.2- Síntese solúvel de peptídeos

A seqüência correspondente ao diepitopo identificado (GREGYPADGGGLPDSVKI) foi manualmente sintetizada pelo método de Fmoc descrito em Materiais e Métodos. Após o tratamento de clivagem e liofilização, o peptídeo produzido foi submetido à purificação em coluna C18 utilizando um sistema AKTA.

O perfil obtido está demonstrado na Fig.14. Foram eluidos dois picos maiores na faixa de concentração de 50% de acetonitrila. Estes foram coletados e liofilizados para caracterização em espectrômetro de massa.

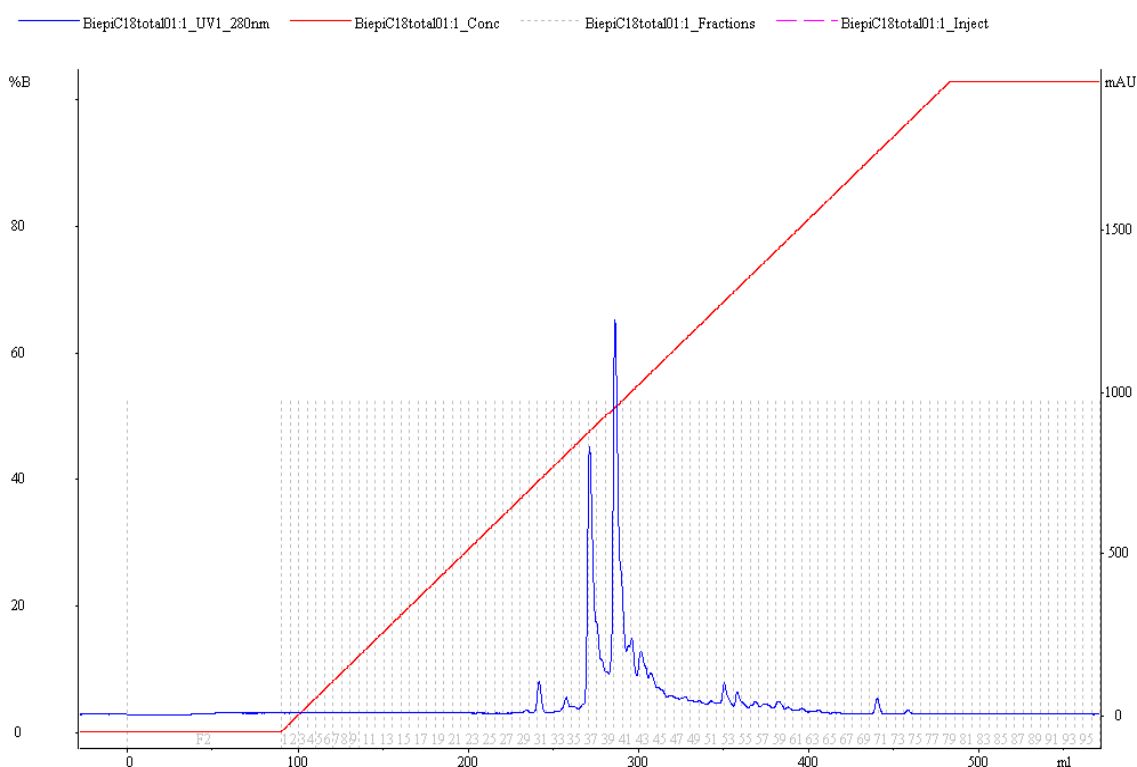


Figura 14: Cromatograma referente à purificação do diepitopo manualmente sintetizado. A purificação foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu) tendo como eluentes TFA 0,1% e um gradiente de acetonitrila. O fluxo utilizado foi de 1ml/min. Foram coletadas frações de 5 ml por tubo. Os picos foram obtidos pela leitura da absorbância das frações á 280nm. As frações correspondentes a cada pico foram agrupadas e liofilizadas.

A análise por espectrometria de massa confirmou a pureza e a massa teórica esperada para o peptídeo em questão (1891 Da), que foi obtida no primeiro pico da cromatografia (Fig. 15).

No segundo pico foi obtida uma massa de 1996 Da (dado não mostrado), que corresponde à massa do diepitopo acrescida de uma serina (105 Da), que pode ter sido acoplada erroneamente durante a síntese.

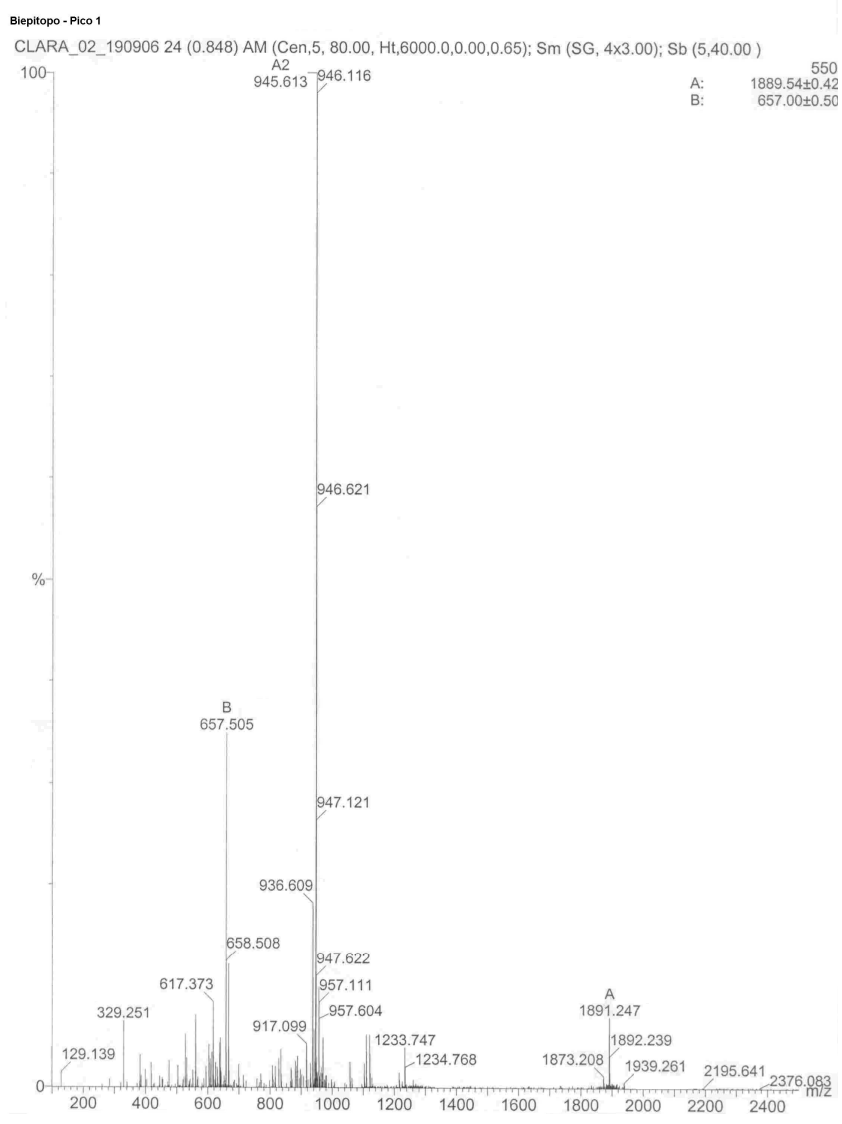


Figura 15: Gráfico referente à caracterização do diepitopo purificado por espectrometria de massas pelo método de ESI-TOF. A massa esperada era de 1890 Da. Uma massa de 1889 foi identificada no pico A2, sendo este referente a ligação de 2 cargas.

4.3- Caracterização antigênica do diepitopo

De posse do diepitopo sintetizado e purificado, foi necessário verificar se ele apresenta em fase solúvel a mesma propriedade antigênica identificada no ensaio de SPOT.

Para isso, uma placa de ELISA foi sensibilizada com 1 µg do peptídeo por well e a ligação de anticorpos contidos em soros de coelho anti-veneno total de *Tityus serrulatus* e anti-TsNTxP ao peptídeo foi avaliada conforme metodologia descrita em Materiais e Métodos.

As reatividades obtidas para os soros testados foram maiores em relação ao controle (soro de coelho pré-imune) demonstrando que o diepitopo sintetizado foi propriamente reconhecido (Fig. 16). Dessa forma pode-se afirmar que as propriedades antigênicas demonstradas pelo diepitopo imobilizado na membrana de celulose no ensaio de SPOT foram mantidas no peptídeo sintetizado.

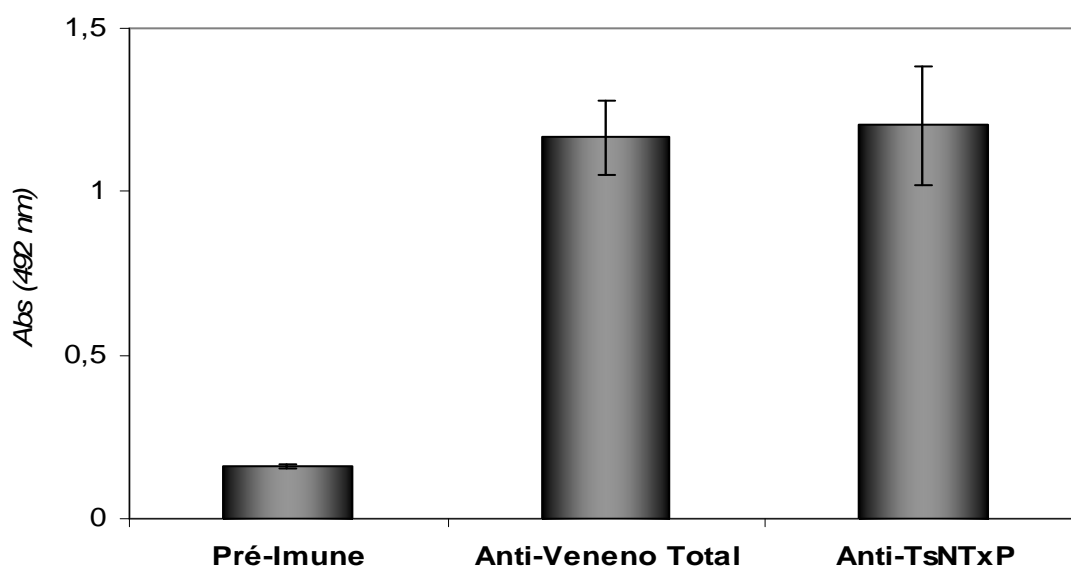


Figura 16: ELISA para a verificação da antigenicidade do peptídeo produzido. A placa foi sensibilizada com 1 µg do peptídeo por well. Foram utilizados soros de coelho previamente produzidos no laboratório segundo condições semelhantes às descritas em Materiais e Métodos em diluições de 1:100.

4.4- Produção do imunógeno

Uma vez confirmado que o peptídeo sintetizado apresenta as características físicas e antigênicas esperadas, ele pode ser utilizado para a produção de soros visando sua caracterização imunogênica.

Entretanto, por se tratar de um peptídeo, uma molécula pequena que possivelmente não seria reconhecido pelo sistema imune e provavelmente não seria capaz de provocar uma resposta imunológica satisfatória, esse peptídeo foi utilizado na produção de imunógenos de maior tamanho.

Foram escolhidas duas abordagens: o acoplamento do peptídeo a uma proteína imunogênica maior (OVA); e a ligação cruzada do próprio peptídeo, formando um polímero. A produção dos imunógenos se deu como previamente descrito em Materiais e Métodos.

Os imunógenos foram testados quanto a sua capacidade de reagir com anticorpos anti-TsNTxP (propriedades antigênicas). Utilizamos o teste de ELISA, onde a placa foi sensibilizada com 1µg dos imunógenos, 1µg de OVA como controle negativo, e 1µg do peptídeo sintético que simula o diepitopo e 1µg de TsNTxP como controles positivos. Foi utilizado também na sensibilização 1µg de um peptídeo não relacionado como controle negativo. Como fonte de anticorpos foi usado soro de coelho anti-TsNTxP, utilizado nos experimentos prévios em concentração de 1:100.

Verificou-se que, os imunógenos continuaram sendo reconhecidos pelo soro anti-TsNTxP. OVA e o peptídeo não relacionado não reagiram com o soro (Fig. 17).

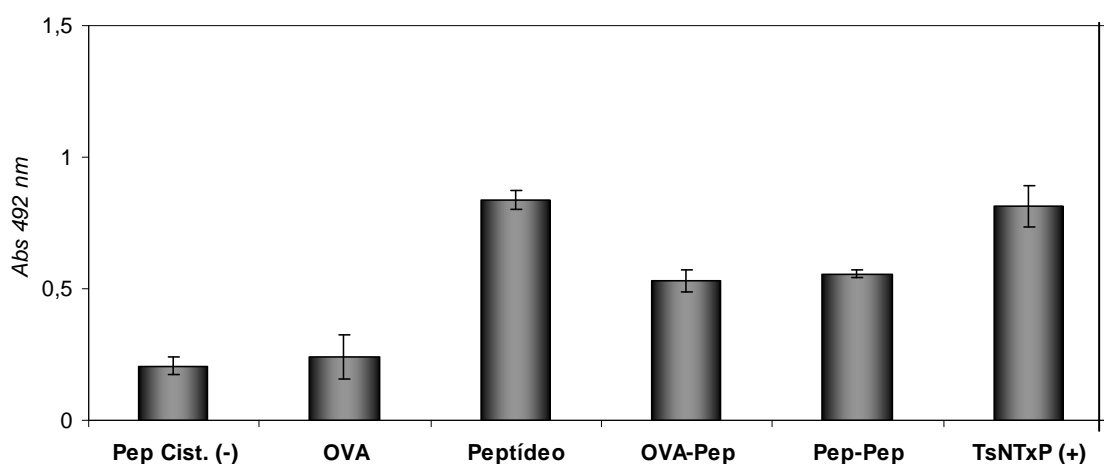


Figura 17: ELISA para a verificação da qualidade dos imunógenos OVA-Pep e Pep-Pep produzidos. A placa foi sensibilizada com 1 µg de OVA, somente peptídeo, TsNTxP, OVA-Pep ou Pep-Pep por well. Foi utilizado soro de coelho anti-TsNTxP previamente produzido no laboratório segundo condições semelhantes às descritas em Materiais e Métodos em diluições de 1:100.

4.5- Caracterização imunogênica do diepitopo identificado

A partir da confirmação da qualidade dos imunógenos produzidos, estes foram utilizados em programas de imunização de camundongos e coelhos conforme descrito em Materiais e Métodos.

4.5.1- Camundongos

4.5.1.1- Após 1 semana

O soro dos camundongos imunizados retirados uma semana após a última dose foram testados individualmente quanto a sua reação com o diepitopo produzido, para verificar a capacidade deste de gerar uma resposta imunológica específica. Como controle foi utilizado um pool dos soros dos camundongos do grupo controle, que receberam apenas PBS em adjuvante de Freund sob as mesmas condições dos grupos experimentais. A placa foi sensibilizada com 1µg do peptídeo por well e os soros foram testados em diluição de 1:100.

Na ELISA feita com os soros individuais, o grupo imunizado com OVA-Pep apresentou reatividade de modo geral (Fig. 18) enquanto o grupo Pep-Pep apresentou reação semelhante á do controle, embora ambos os imunógenos tenham apresentando qualidade equiparável no teste feito anteriormente (Fig. 19).

Para confirmar esta diferença de imunogenicidade, foi realizada outra ELISA utilizando pools contendo 10 µl dos soros dos animais de cada grupo. Neste ensaio foi confirmada a maior reatividade do soro produzido pelo imunógeno OVA-Pep em relação os imunógeno Pep-Pep (Fig. 20).

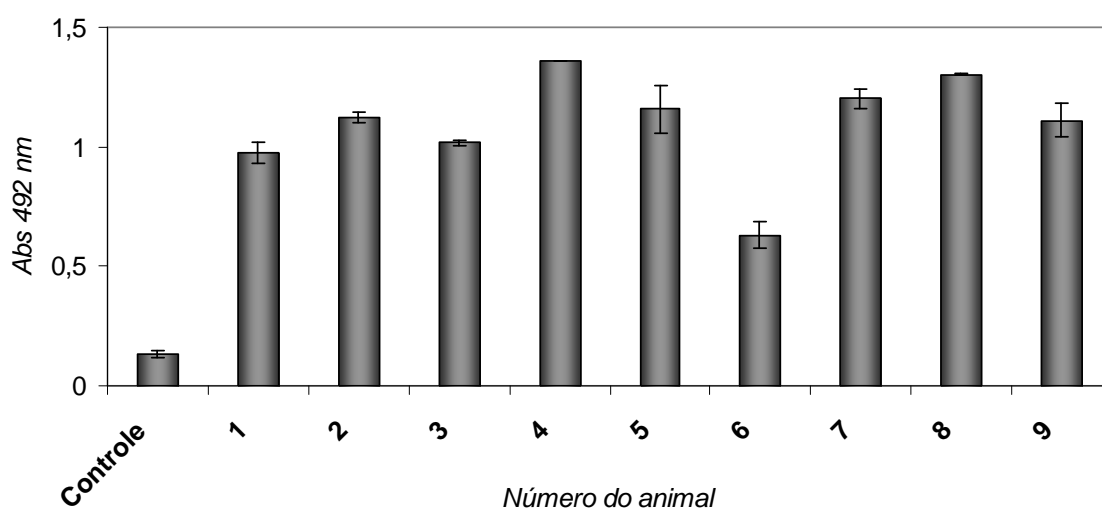


Figura 18: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos anti-OVA-Pep em camundongos. A análise de cada soro foi feita individualmente para a verificação da imunogenicidade. A placa foi sensibilizada com 1 µg do peptídeo por well. Os soros produzidos como mencionado em Materiais e Métodos foi utilizado na diluição de 1:100.

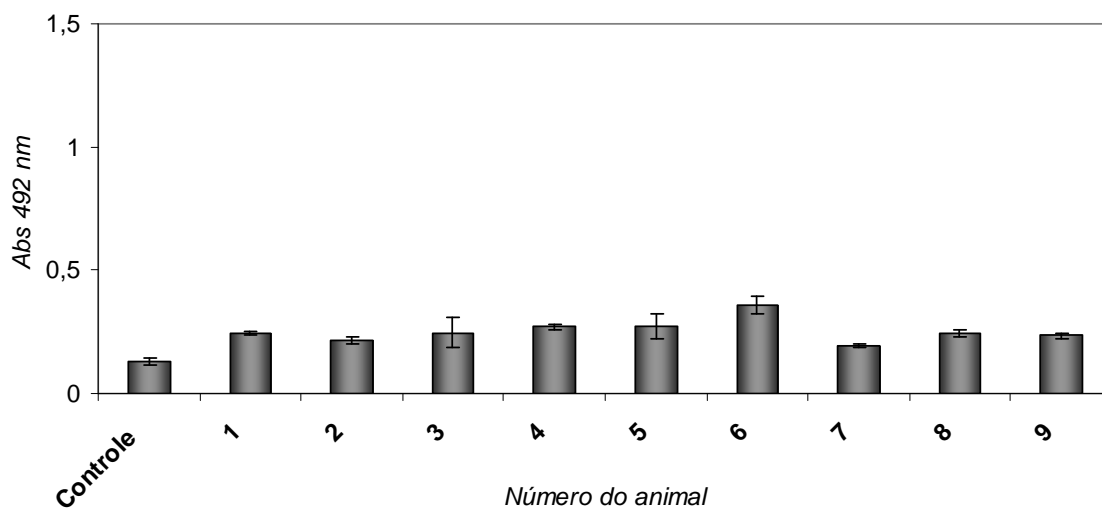


Figura 19: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos anti-Pep-Pep em camundongos. A análise de cada soro foi feita individualmente para a verificação da imunogenicidade. A placa foi sensibilizada com 1 μg do peptídeo por well. Os soros produzidos como mencionado em Materiais e Métodos foi utilizado na diluição de 1:100.

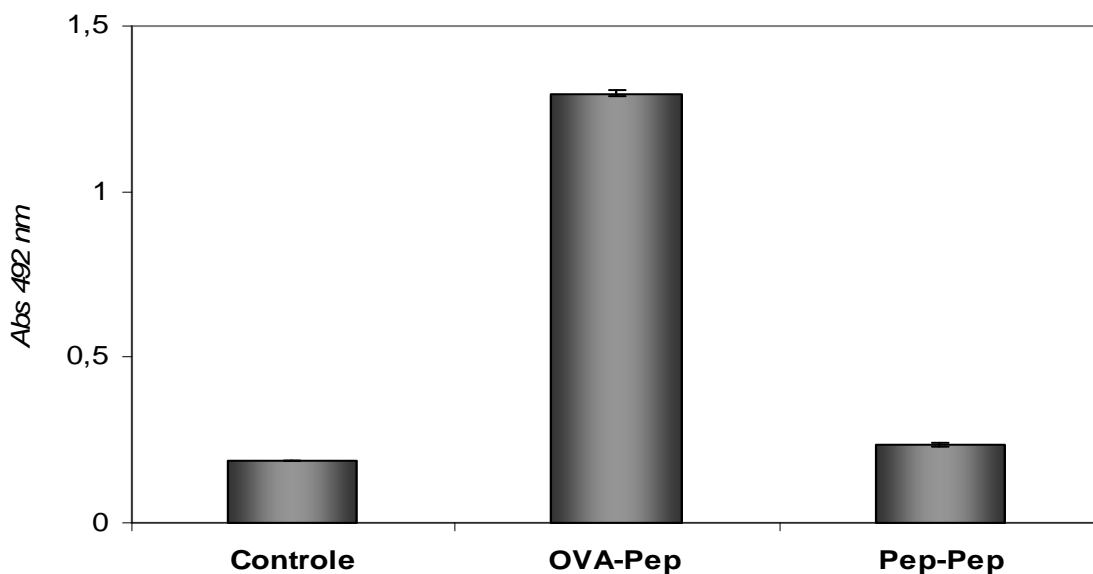


Figura 20: ELISA para a comparação dos imunógenos OVA-Pep e Pep-Pep produzidos. Foi testado pool contendo 10 μl de soro de cada animal imunizado especificamente com cada um dos imunógenos OVA-Pep ou Pep-Pep. A placa foi sensibilizada com 1 μg do peptídeo por well. Os pools de soro foram utilizados na diluição de 1:100.

4.5.1.2- Após 9 semanas

Tendo-se passado 9 semanas após a última dose de imunógeno administrada e sem quaisquer outros tratamentos, 3 animais de cada grupo foram novamente sangrados e seus soros testados novamente em ELISA, sendo as placas sensibilizadas com 1 μ g do peptídeo por well e o soro testado na diluição de 1:100.

Foi notado um declínio na reatividade do soro dos animais imunizados com OVA-Pep, entretanto essa continuou maior em relação ao controle e ao grupo imunizado com Pep-Pep, demonstrando persistência da resposta mesmo após o fim do ciclo de imunização (Fig. 21).

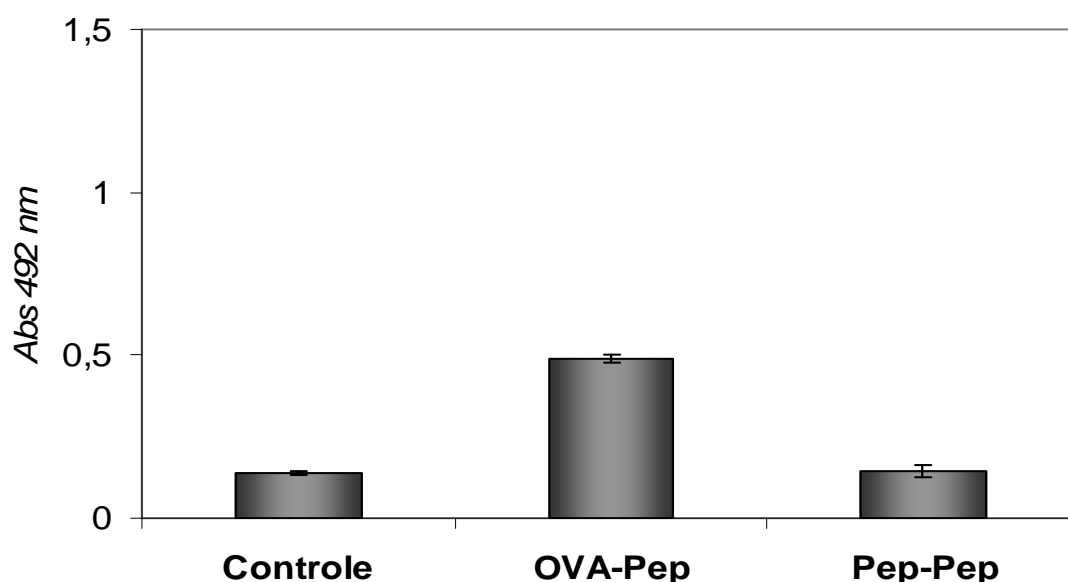


Figura 21: ELISA para a verificação da persistência da resposta aos imunógenos produzidos em camundongos. . O soro analisado corresponde a um pool contendo o soro de 3 animais. A placa foi sensibilizada com 1 μ g do peptídeo por well. Os soros produzidos como mencionado em Materiais e Métodos foi utilizado na diluição de 1:100.

4.5.2- Coelhos

O soro dos coelhos imunizados retirados uma semana após a última dose foram testados individualmente quanto a sua reação com o peptídeo produzido, para verificar a capacidade deste de gerar uma resposta imunológica específica. Como controle foi utilizado um pool de soros pré-imune retirados dos mesmos animais utilizados na imunização. A placa foi sensibilizada com 1µg do peptídeo por well e os soros foram testados em diluição de 1:100.

Novamente neste ensaio, o grupo imunizado com OVA-Pep apresentou maior reatividade enquanto o grupo Pep-Pep apresentou reação semelhante á do controle. Não houve diferença significativa entre a reatividade de animais de um mesmo grupo (Fig. 22). Os valores de reatividade alcançados foram considerados baixos e uma 5ª dose, a título de reforço, foi administrada aos animais do grupo OVA-Pep uma semana após a sangria feita. Uma nova sangria foi realizada uma semana após a 5ª dose.

A reatividade dos soros dos coelhos anti-OVA-Pep após a 5ª dose aumentou cerca de 0,3 unidades de absorvância em relação ao soro retirado após a 4ª dose (Fig. 23).

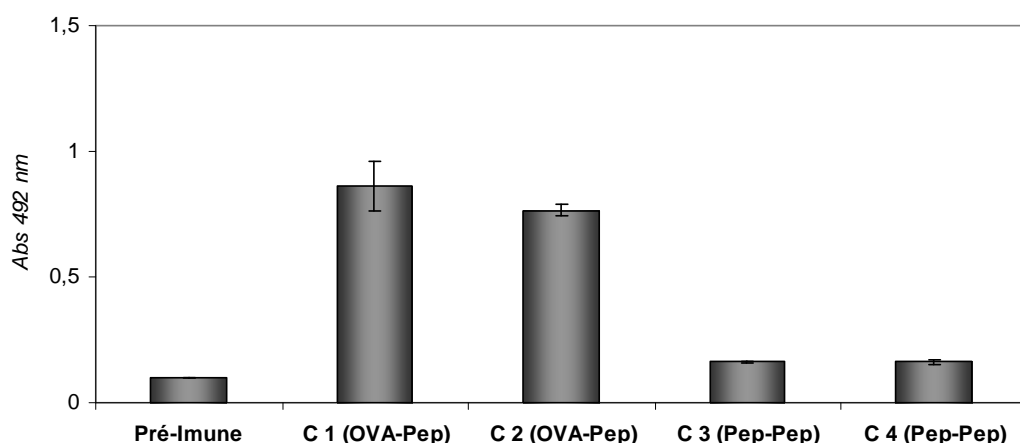


Figura 22: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos contra os imunógenos produzidos em coelhos. A análise do soro de cada coelho foi feita individualmente para a verificação da imunogenicidade. A placa foi sensibilizada com 1 μ g do peptídeo por well. Os soros produzidos como mencionado em Materiais e Métodos foi utilizado na diluição de 1:100.

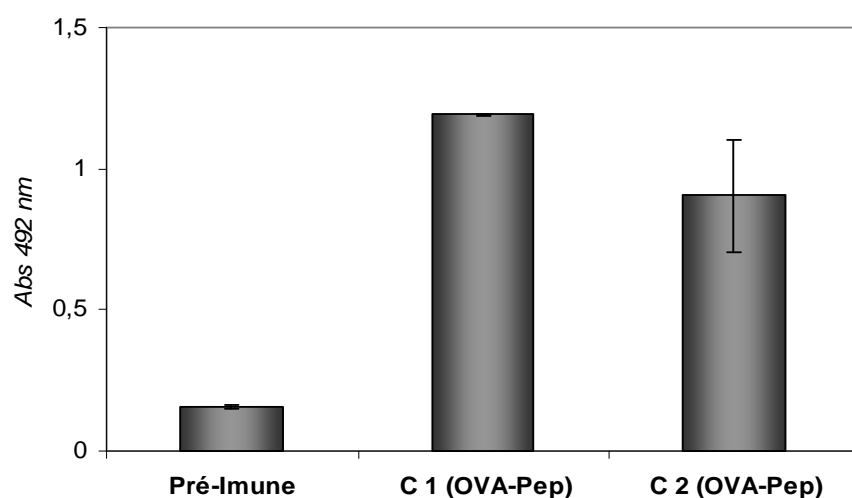


Figura 23: ELISA para a verificação da produção de anticorpos específicos contra os imunógenos produzidos em coelhos após dose de reforço. A análise do soro de cada coelho foi feita individualmente (C1 Ova-Pep e C2 Ova-Pep) para a verificação da imunogenicidade. Os resultados para os soros Pep-Pep não foram mostrados, pois não demonstraram alteração em relação à primeira sangria. A placa foi sensibilizada com 1 μ g do peptídeo por well. Os soros produzidos como mencionado em Materiais e Métodos foi utilizado na diluição de 1:100.

4.6- Ensaios de neutralização

4.6.1- In vivo

Uma semana após a sangria realizada para coleta do soro, 6 camundongos de cada um dos grupos imunizados foram utilizados em ensaios de neutralização *in vivo*, para testar o potencial neutralizante dos anticorpos produzidos específicos para o diepitopo identificado (Tab. 4).

Inicialmente foi feito um ensaio com 2 animais de cada grupo utilizando uma dose do veneno total de *Tityus serrulatus* equivalente a 2.3 LD₅₀ (equivalente á 34,5 µg de veneno para cada 20 g do animal). Neste ensaio, os animais imunizados com OVA-Pep foram totalmente protegidos contra os efeitos letais do veneno, apresentando poucos sintomas de intoxicação. No grupo imunizado com Pep-Pep, um animal sobreviveu ao desafio, mas este se encontrou visivelmente mais debilitado pelos sintomas do envenenamento, como diarreia e dificuldade respiratória, do que os animais sobreviventes do grupo OVA-Pep. Os animais do grupo controle morreram 1h após a injeção do veneno.

Com estes resultados, foi realizado novo ensaio, utilizando um maior número de animais (4 por grupo) e uma maior quantidade de veneno (2.8 LD₅₀, equivalente a 42 µg de veneno para cada 20 g do animal). O grupo imunizado com OVA-Pep foi novamente o que apresentou maior número de sobreviventes, e também o que apresentou sintomatologia de envenenamento mais branda (Tab. 4).

Tabela 4: Número de animais desafiados sobreviventes em ensaios de neutralização *in vivo*. O ensaio foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos

Grupos	2.3 LD50		2.8 LD50	
	Número de sobreviventes	%	Número de sobreviventes	%
Controle	0/2	0	0/4	0
Pep-Pep	1/2	50	1/4	25
OVA-Pep	2/2	100	2/4	50

4.6.2- *In vitro*

Para testar o potencial neutralizante dos soros de coelho gerados contra o imunógeno OVA-Pep, foi realizado um ensaio de neutralização *in vitro* conforme descrito em Materiais e Métodos.

Inicialmente, o teste foi realizado em grupos de 6 camundongos utilizando uma quantidade de veneno equivalente a 3 LD₅₀ (45 µg de veneno por cada 20 g do animal) e 200µl de salina, sem nenhum tipo de soro no grupo **S**, 200µl de soro pré-imune no grupo **P** e 200µl de soro imune no grupo **I**.

O soro anti-OVA-Pep não foi capaz de neutralizar os efeitos letais e tóxicos do veneno, mas foi capaz de retardar o aparecimento dos sintomas e da morte, como demonstrado na Tab. 5.

Tabela 5: Demonstração da sintomatologia tempo de morte apresentada pelos grupos de camundongos no ensaio de neutralização in vitro com 3 LD₅₀. O ensaio foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos

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

Um novo ensaio, utilizando menor quantidade de veneno foi realizado (1 LD₅₀, equivalente a 15 µg de veneno por cada 20 g do animal). Foram utilizados os mesmo parâmetros descritos para o ensaio prévio.

Neste novo ensaio, não houve morte de nenhum animal de nenhum grupo. Porém os sintomas de envenenamento foram apresentados pelos grupos **P** e **S** e tiveram o seu início retardado no grupo **I** (Tab. 6).

Tabela 6: Demonstração da sintomatologia tempo de morte apresentada pelos grupos de camundongos no ensaio de neutralização in vitro com 1LD₅₀. O ensaio foi realizado conforme descrito em Materiais e Métodos

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 houve nenhuma morte.</i>														

4.7- Análise do soro de coelho OVA-Pep por SPOT

Com o intuito de verificar a especificidade dos anticorpos presentes no soro dos coelhos imunizados com OVA-Pep, foi realizado um ensaio de SPOT, utilizando a mesma membrana previamente testada para a identificação dos possíveis epítopos conformacionais (Fig. 24). O ensaio também foi conduzido como previamente descrito. Não foi utilizado o programa NIH Image para a determinação da reatividade, sendo esta feita apenas por análise visual dos spots.

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

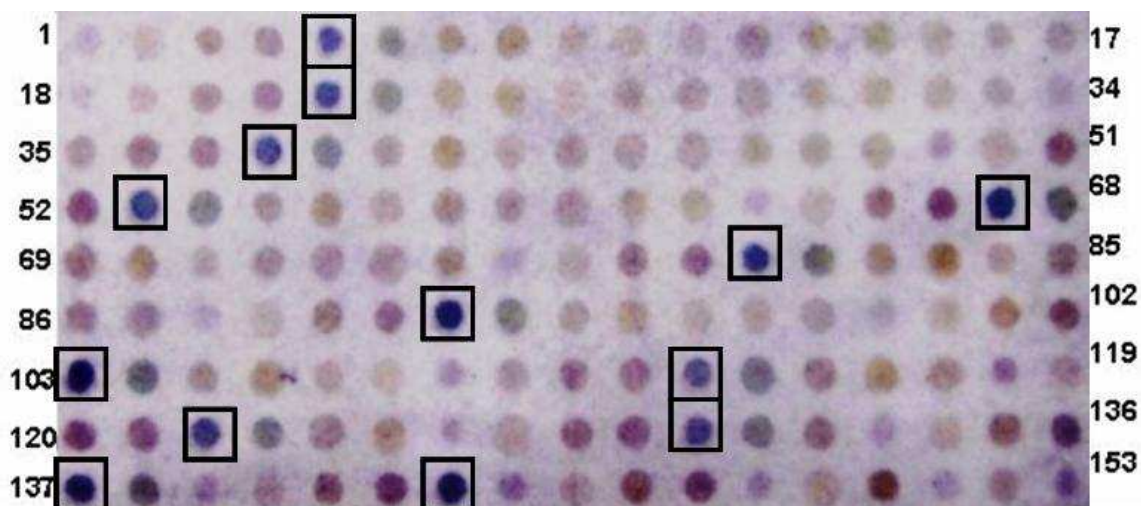


Figura 24: Resultado do imunoenensaio de SPOT modificado para TsNTxP testado com soro anti-OVA-Pep de coelho. Membrana contendo seqüências de peptídeos conformacionais da TsNTxP testada com soro de coelho anti-OVA-Pep produzido como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 7: Seqüências dos peptídeos conformacionais reativos identificados por SPOT.

Número do SPOT	Seqüência
5	GREGYPADGGGLPDSVKI
22	GYPADSKGGGLPDSVKI
38	ADSKGCKIGGGLPDSVKI
53	KGCKITCFGGGLPDSVKI
67	KITCFLTAGGGLPDSVKI
79	CFLTAAGYGGGLPDSVKI
92	TAAGYCNTGGGLPDSVKI
103	GYCNTECTGGGLPDSVKI
113	NTECTLKKGGGLPDSVKI
122	CTLKKGSSGGGLPDSVKI
130	KKGSSGYCGGGLPDSVKI
137	SSGYCAWPGGGLPDSVKI
143	YCAWPACYGGGLPDSVKI

5- DISCUSSÃO

O escorpião *Tityus serrulatus* é responsável por mais de 10.000 acidentes de envenenamento de relevância médica por ano no Brasil (Cardoso et al. 1995). O tratamento empregado nesses casos é a soroterapia, utilizando plasma hiperimune de cavalos produzido contra o veneno total do escorpião (Resende et al. 1995). Essa produção é problemática uma vez que apresenta grande dano ao animal produtor, que sofre os sintomas do envenenamento (Machado de Ávila et al. 2004). Na tentativa de melhorar este quadro, vários trabalhos vêm indicando imunógenos alternativos para a substituição do veneno total na produção do soro, sem a perda de sua qualidade. Dentre as alternativas apresentadas estão a detoxificação do veneno pela interligação de seus componentes (Machado de Ávila et al, 2004; Kharrat et al. 1997), encapsulação do veneno em lipossomas (Chávez-Olórtegui et al. 1991), o uso de peptídeos sintéticos (Alvarenga et al. 2002, Calderon-Aranda et al. 1995; Devaux et al. 1997; Maria et al. 2005; Shinnick et al. 1983) e anatoxinas naturais imunogênicas, que vem sendo identificadas no veneno de vários escorpiões (Chavez-Olortegui et al. 1996; Martin-Eauclaire et al. 2006; Srairi-Abid et al. 2000). Entretanto, para que essas alternativas obtenham sucesso, é necessário um profundo estudo imunológico destas (Krifi et al. 1999).

No contexto do veneno de *T. serrulatus*, uma proteína não-tóxica TsNTxP, isolada do veneno do escorpião *T. serrulatus*, é capaz de induzir anticorpos que apresentam reação cruzada com as principais toxinas presentes no veneno desse escorpião. Esses anticorpos ainda apresentam efeito neutralizante *in vivo* e *in vitro* (Chavez-Olortegui et al. 1997; Moreira-Ferreira et al. 1998). Além dessas propriedades imunogênicas, a TsNTxP é uma anatoxina natural presente na fração tóxica do veneno, o que a torna um interessante alvo de pesquisa para a produção de imunoterápicos contra o veneno do *T. serrulatus* (Gazarian et al. 2005), principal espécie causadora de acidentes de relevância médica em Minas Gerais.

O estudo sistemático de mapeamento de epitopos contínuos da TsNTxP já havia previamente indicado que os quinze resíduos da porção N-terminal

(GREGYPADSHGCKIT) e os resíduos 47-61 da porção C-terminal (GLDPSVKIWTSETNK) são regiões fortemente reconhecidas por anticorpos gerados em diferentes animais (Mendes et al. 2004). O estudo aqui apresentado reforça esta afirmação.

Além disso, as regiões N-terminal e C-terminal das toxinas Ts II (Mansuelle et al. 2002), Ts IV (Martin-Eauclaire et al. 1994), e da toxina TsVII (Bechis et al. 1984) foram reconhecidas cruzadamente por anticorpos anti-TsNTxP, produzidos em diferentes animais. Estes resultados discordam um pouco de outros estudos com venenos de outros escorpiões, onde foi verificado que, apenas a região N-terminal integra um sítio imunodominante nestas toxinas (Darbon et al. 1983; Devaux et al. 1993). Por outro lado foi verificado que a região C-terminal é, uma região que está associada com a interação com os canais de sódio, e por isso alvo de interesse (Chavez-Olortegui et al. 2002; Fontecilla-Camps et al. 1980; Maria et al. 2005; Polikarpov et al. 1999).

Visto que todos os trabalhos anteriormente descritos foram estudos que caracterizam epitopos lineares contínuos, neste trabalho um protocolo de SPOT otimizado (Reineke et al. 1999), especialmente adaptado para a detecção de sítios de ligação descontínuos foi utilizado para o mapeamento de epitopos conformacionais da TsNTxP, no intuito de produzir e caracterizar imunógenos, a partir de epitopos sintéticos conformacionais, que sejam capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes.

Para que um dado epitopo possa ser considerado conformacional ele deve ser composto por resíduos que se encontram distantes na seqüência primária da proteína, mas que são aproximados pelo seu dobramento, constituindo uma região que deve ser capaz de ser reconhecida como um todo pela molécula de imunoglobulina. O método de SPOT otimizado (Reineke et al. 1999) permite cumprir estes requisitos básicos, através da preparação de uma membrana de celulose contendo peptídeos descontínuos formados por uma seqüência linear de oito resíduos de aminoácidos proveniente da porção N-terminal e outra parte também de oito resíduos de aminoácidos da porção C-

terminal da TsNTxP. Para promover o enovelamento independente destas duas seqüências, o dipeptídeo linear e flexível, Gli-Gli, foi inserido entre as duas regiões, gerando dipeptídeos descontínuos contendo a fórmula (X_8) - Gli-Gli - (X_8) .

O mapeamento de regiões epitópicas descontínuas ou conformacionais da TsNTxP foi realizado, utilizando anticorpos desenvolvidos em coelhos imunizados com TsNTxP (Alvarenga et al. 2002), sendo analisada a reatividade de peptídeos individuais imobilizados em membranas de celulose contendo seqüências que se sobrepõem, cobrindo toda a seqüência da proteína estudada. Foram construídos 153 peptídeos sobrepostos contendo 18 resíduos $\{(X_8)$ - Gly-Gly- $(X_8)\}$ de aminoácidos cobrindo toda a seqüência da TsNTxP. Este ensaio revelou um epitopo imunodominante contendo duas regiões antigênicas na seqüência da TsNTxP, uma na região N-terminal, (resíduos 1–8 (GREGYPAD)) e outra na região C-terminal (resíduos 47–54(GLPDSVKI)).

O alinhamento do diepitopo GREGYPADGGGLPDSVKI com as regiões correspondentes das principais toxinas de *Tityus* mostrou que estas regiões se encontram conservadas, principalmente no que diz respeito à distribuição de aminoácidos carregados e de aminoácidos como tirosina, que possuem características próprias que exercem grande influência na estrutura da proteína. Estas características reforçam a idéia de que o diepitopo identificado pode corresponder a uma região imunodominante nas proteínas analisadas. Um estudo realizado previamente por Chavez-Olortegui et al. (2002) determinou os resíduos críticos envolvidos na ligação dos anticorpos neutralizantes com a TsNTxP (Tab. 8). Dos 6 resíduos identificados neste trabalho, 4 estão presentes no diepitopo aqui identificado. Dessa forma, a grande reatividade do diepitopo com os soros anti-veneno total e anti-TsNTxP é coerente com os achados anteriores, e o seu estudo aprofundado é justificado, uma vez que ele é composto justamente pelas importantes regiões descritas acima.

Tabela 8: Resíduos de aminoácidos críticos na antigenicidade da TsNTxP e de toxinas do veneno de *T. serrulatus* (Chavez-Olortegui et al. 2002).

Protein	N-terminal peptide		C-terminal peptide
	3 5 8		50 55 58 61
NTP	GREGYPADSKGCKIT	--	PDSVKIWTSETNKCG
Ts II	-K <u>E</u> G <u>Y</u> AM <u>D</u> HEGCKFS	--	P <u>D</u> H <u>I</u> K <u>V</u> W <u>D</u> Y <u>A</u> T <u>N</u> K <u>C</u>
Ts VII	-K <u>E</u> G <u>Y</u> LM <u>D</u> HEGCKLS	--	P <u>N</u> W <u>V</u> K <u>V</u> W <u>D</u> R <u>A</u> T <u>N</u> K <u>C</u>
Ts IV	K <u>K</u> <u>D</u> G <u>Y</u> P <u>V</u> E <u>Y</u> D <u>N</u> C <u>A</u> Y <u>I</u>	--	P <u>D</u> SEPT <u>K</u> --T <u>N</u> G <u>K</u> CKSGKK

*_: os resíduos sublinhados são os mais importantes na interação com o anticorpo.

A disponibilidade do modelo da estrutura tridimensional da TsNTxP (Chavez-Olortegui et al. 2002) foi importante para a validação da identificação de um epítipo descontínuo, uma vez que apenas assim foi possível prever se os resíduos identificados como componentes do epítipo estão aproximados e podem formar uma região coerente (Van Regenmortel 1996). As dimensões inferidas para o diepítipo identificado, tendo como base seu modelo tridimensional construído sobre a estrutura elucidada da TsVII (Polikarpov et al. 1999), demonstram que essa região possui medidas que são compatíveis com aquelas possíveis para o sítio de reconhecimento de um anticorpo (Fig. 13). Dessa forma, a seqüência do epítipo identificado por SPOT apresentou localização estrutural possível e as propriedades imunoquímicas condizentes com as de um epítipo conformacional, sendo um indício de que o método desenvolvido pode ser utilizado para este fim.

Uma vez identificado um epítipo descontínuo da TsNTxP, e tendo em vista a homologia desta parte da proteína com algumas toxinas, este peptídeo foi preparado sinteticamente e utilizado na indução de anticorpos neutralizantes, constituindo um dos objetivos desta tese. A polimerização de peptídeos bem como o seu acoplamento a proteínas maiores são abordagens comumente utilizadas para conferir maior imunogenicidade á peptídeos sintéticos. Isso ocorre porque se cria um microambiente mais favorável à indução da conformação nativa do peptídeo, além da proteína carreadora imunogênica estimular células T que auxiliam na montagem da resposta (Van Regenmortel, 2001). O protocolo de acoplamento do diepítipo com a OVA se

mostrou bem sucedido, mas o peptídeo polimerizado não foi capaz de gerar respostas humorais detectáveis nos animais imunizados. Isso pode ter se dado, pelo bloqueio os aminoácidos imunogênicos importantes, uma vez que a polimerização por glutaraldeído se faz através da interligação entre resíduos de lisina, resíduo importante para a antigenicidade da molécula (Chavez-Olortegui et al. 2002). Algumas técnicas de controle para a polimerização de peptídeos visando à formação de imunógenos já foram descritos na literatura e podem ser empregados futuramente para a melhoria deste protocolo (Sadler et al. 2002).

Para que um dado peptídeo sintético seja interessante para a produção de imunoterápicos é necessário que ele seja não apenas antigênico, ou seja, capaz de ser reconhecido por um anticorpo previamente produzido, mas também imunogênico, capaz de provocar a produção de anticorpos específicos em um sistema biológico (Van Regenmortel 2001). O programa de imunização de camundongos foi adequado à produção de anticorpos específicos, que se mostraram eficazes na proteção dos animais imunizados contra os efeitos tóxicos e letais do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. A administração de um segundo ciclo de imunizações poderia ser importante para aumentar a resposta, tornando a proteção mais ampla e eficaz contra dosagens maiores do veneno.

A resposta ao diepitopo também se mostrou persistente, sendo possível a detecção de anticorpos circulantes específicos mesmo decorridas 9 semanas do fim da imunização. Um segundo ciclo de imunização poderia aumentar essa quantidade de anticorpos persistentes, possivelmente a títulos neutralizantes, extendendo assim não só a presença de uma quantidade elevada de anticorpos, mas também a proteção contra os efeitos letais do veneno promovida por eles.

A persistência da resposta humoral específica é interessante para o possível desenvolvimento de uma vacina. A utilização de um peptídeo sintético para este fim é uma boa abordagem, uma vez que possibilita a alta especificidade, baixo risco de efeitos colaterais e a produção em larga escala (Schunk & Macallum, 2005). A construção de vacinas contra animais

peçonhentos já foi aventada por diversos pesquisadores da área (Calderon-Aranda et al. 1995; Chavez-Olortegui et al. 2002; Chippaux & Goyffon, 1998; Gazarian et al. 2005), tendo em vista a proteção de populações que vivem em regiões endêmicas de animais perigosos e distantes de centros médicos equipados para o tratamento contra eventuais acidentes. Essa vacina hipotética teria como objetivo a proteção total contra o envenenamento, mas um imunógeno que favorecesse ao menos um retardo significativo no aparecimento dos sintomas já seria relevante, pois aumentaria a janela de tempo disponível antes do aparecimento da sintomatologia mais grave para um indivíduo até o início ao tratamento médico adequado.

O desenvolvimento dessa vacina é dificultado pelo fato do envenenamento ser um evento agudo, no qual não é dado tempo suficiente ao sistema imunológico para o estabelecimento de uma resposta específica. Para a proteção efetiva, é necessário que se obtenha altos níveis duradouros de anticorpos circulantes. Alguns trabalhos demonstraram que a imunização via mucosa (oral e nasal) gera uma produção duradoura de anticorpos, que se estabiliza em níveis altos ou baixos de acordo com a dose inicial administrada. Outros métodos de manutenção de altos níveis séricos de anticorpos já foram também propostos, valendo-se da ativação policlonal de células B, independentemente do antígeno específico (Bernasconi et al. 2002; Verdolin et al. 2001; Traggiai et al. 2003).

A imunização dos coelhos também apresentou melhores resultados com o imunógeno OVA-Pep do que com o imunógeno Pep-Pep. Entretanto, para atingir níveis de anticorpos específicos produzidos semelhantes aos dos camundongos foi necessária a administração de uma dose extra de imunógeno.

Apesar de ter apresentado reatividade elevada de anticorpos específicos, o soro dos coelhos não apresentou propriedades neutralizantes dos efeitos letais do veneno, ainda que tenha sido capaz de retardar os sintomas do envenenamento e o tempo do óbito. Este pode ser considerado

um resultado expressivo, mas poderia se beneficiar de melhorias no protocolo que aumentassem especificidade do soro e seu potencial neutralizante.

Analisado o perfil de reatividade dos anticorpos contidos soro produzido em coelhos pela mesma metodologia de SPOT empregada para a identificação do diepitopo, pode-se encontrar uma possível explicação para a baixa potência do soro de coelhos. O soro se mostrou reativo apenas com os peptídeos provenientes da região C-terminal, não apresentando qualquer reação detectável com a região N-terminal tanto na membrana contendo os peptídeos conformacionais quanto na membrana contendo os peptídeos lineares.

Esse resultado vai contra alguns dados da literatura, uma vez que a região N-terminal é dada como sendo bastante imunogênica (Darbon et al. 1983; Devaux et al. 1993) e ainda assim não foi capaz de promover a produção de anticorpos específicos em coelhos. Entretanto, isso pode ter ocorrido devido a uma inacessibilidade da seqüência relativa a porção N-terminal, promovida pelo seu bloqueio com a proteína conjugada (OVA), impedindo que a região fosse reconhecida pelo sistema imune.

Um outro aspecto intrigante desse resultado é o fato de que os anticorpos produzidos no soro de coelho foram contra a região C-terminal e teoricamente seriam eles os principais responsáveis pela neutralização dos efeitos tóxicos e letais do veneno, uma vez que esta região se encontra próxima ou sobreposta ao sítio de ligação das toxinas aos canais iônicos. Entretanto esse efeito neutralizante não foi observado nos estudos de neutralização in vitro. Uma hipótese para explicar essa situação seria que de fato os anticorpos contra a região C-terminal seria realmente os responsáveis pelos efeitos de neutralização do veneno e apesar de estarem presentes em concentrações altas no soro, não estariam ainda em quantidade suficiente para efetivamente neutralizar seus efeitos. Isso é condizente com o que foi observado nos ensaios de neutralização in vitro, nos quais a sintomatologia de envenenamento foi de fato adiada, mostrando a existência de anticorpos neutralizantes, mas não foi possível evitar o óbito, mostrando que esses anticorpos não foram suficientes para a neutralização efetiva.

6- CONCLUSÕES

- A técnica de SPOT modificada utilizada se mostrou rápida e eficiente para o mapeamento das regiões imunogênicas descontínuas da TsNTxP.
- As regiões N-terminal e C-terminal que compõem o diepitopo identificado são conservadas nas principais toxinas do veneno de *Tityus serrulatus*.
- O diepitopo identificado pela técnica de SPOT modificada constitui um epitopo conformacional na superfície da TsNTxP.
- O diepitopo foi sintetizado, purificado, sua massa molecular confirmada e quando acoplado á ovalbumina, mas não quando polimerizado via glutaraldeído, foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, em camundongos, da atividade letal do veneno total do escorpião *Tityus serrulatus*.
- Apesar de ser capaz de retardar o aparecimento dos sintomas de envenenamento, o soro anti-OVA-Pep produzido em coelhos não foi capaz de neutralizar os efeitos letais do veneno.

7- PERSPECTIVAS

- Modificar o protocolo aqui apresentado, visando à melhoria dos resultados mediante a alteração de:

- a. Proteína carreadora
- b. Protocolo de polimerização
- c. Adjuvante.
- d. Dosagem.
- e. Número de doses.
- f. Intervalo entre as doses.
- g. Via de administração.

- Sintetizar novos peptídeos alterando o tamanho e a composição da seqüência espaçadora do diepitopo identificado para melhor mimetizar a distância e as influências existentes no ambiente da conformação nativa da TsNTxP.

- Utilizar o diepitopo identificado juntamente com a proteína TsNTxP inteira em programa de imunização semelhante ao apresentado, visando a potencialização da resposta.

- Utilizar o diepitopo identificado juntamente com outros peptídeos imunogênicos previamente identificados (Machado de Ávila et al. 2004; Maria et al. 2004) e já sintetizados para a produção de um imunógeno multivalente a ser testado em metodologia semelhante á apresentada neste estudo.

- Estudar os demais diepitopos que se mostraram reativos no ensaio de SPOT modificado quanto às suas propriedades antigênicas e imunogênicas.

- Utilizar o protocolo desenvolvido para o mapeamento de regiões antigênicas descontínuas nas principais toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (TsII, TsIV e TsVII).

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROUG F, EL ATROUS S, NOUIRA S, HAGUIGA H, TOUZI N, BOUCHOUCHA S. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *The Lancet* 1999; 354:906-9
- ALMEIDA FM, PIMENTA AMC, DE FIGUEIREDO SG, SANTORO MM, MARTIM-EAUCLAIRE MM, DINIZ CR, DE LIMA ME. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 2002; 40: 1041-1045.
- ALVARENGA LM, DINIZ CR, GRANIER C, CHAVEZ-OLORTEGUI C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*. 2002; 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. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 2005; 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. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 2005; 46: 271-276.
- AMORIM AM, CARVALHO FM, LIRA-DA-SILVA FM, BRAZIL TK. Acidentes por escorpião em uma área do nordeste de Amaralina, Salvador, Bahia, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 38:51-56
- ANDRADE MV, LISBOA FA, PORTUGAL AL, ARANTES RM, CUNHA-MELO JR. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146:581-7

- BAHLOUL M, REKIK N, CHABCHOUB I, CHAARI A, KSIBI H, KALLEL H, DAMAK H, CHAARI A, HAMIDA CB, CHELLY H, BOUAZIZ M. Neurological complications secondary to severe scorpion envenomation. *Med Sci Monit* 2005; 11: 196-202.
- BARRIO A, VITAL-BRAZIL G. Ein neues Verfahren der Giften Nahme ber Spinnen. *Experientia* 1949; 6:112-113.
- BECERRIL B, MARANGONI S, POSSANI LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* 1997; 35: 821-835
- BECHIS G, SAMPIERI F, YUAN PM, BRANDO T, MARTIN MF, DINIZ CR, ROCHAT H. Amino acid sequence of toxin VII, a β toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1984; 122:1146–1153.
- BERNASCONI NL, TRAGGIAI E, LANZAVECCHIA A. Maintenance of serological memory by policlonal activation of human memory B cells. *Science* 2002; 298:2199-2202
- CALDERON-ARANDA ES, OLAMENDI-PORTUGAL T, POSSANI LD. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine* 1995; 13:1198-206.
- CARDOSO JL, FAN WHR, ARAÚJO AA, SANTALUCIA M, LOPES JM. Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990-1993). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1995; 28 10.
- CATTERALL WA, CESTELE S, YAROV-YAROVY V, YU FH, KONOKI K, SCHEUER T. Voltage gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 2007;49:124-141
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, AIT AMARA D, ROCHAT H, DINIZ C, GRANIER C. In vivo Protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine* 1991; 9 :907-91.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, MOREIRA FERREIRA AM, CORDEIRO M, MARIA WS, RICHARDSON M, DINIZ CR. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello, 1922) Envenomings and their Treatments. 1996. Fondation Marcel Mérieux.Eds C. Bon and M Goyffon. 183-195.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KAPOTHAKIS E, MOREIRA FERREIRA AM, FERREIRA AP, DINIZ CR. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 1997; 35:213-221.

CHAVEZ-OLORTEGUI C, MOLINA F, GRANIER C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Mol Immunol* 2002; 38(11):867–76.

CHIPPAUX JP, GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 1998; 36:823-846

CLOT-FAYBESSE O, JUIN M, ROCHAT H, DEVAUX C. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin I: characterization and use for venom neutralization. *FEBS letters* 1999; 458:313-318.

COLMAN PM, LAVER WG, VARGHESE JN, BAKER AT, TULLOCH PA, AIR GM, WEBSTER RG. Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. *Nature* 1987; 326: 358-363

DARBON H, JOVER E, COURAUD F, ROCHAT H. Scorpion neurotoxin derivatives suitable as potential markers of sodium channel. *Int. J.Peptide Protein Res.* 1983;22:179.

- DE LIMA ME, MARTIM-EAUCLAIRE MF, CHAVEZ-OLORTEGUI C, DINIZ CR, GRANIER C, *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. *Toxicon* 1993; 31:223-227
- DE MATOS IM, TALVANI A, ROCHA OOA, FREIRE-MAIA L, TEIXEIRA MM. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon* 2001; 39: 863-867.
- DEVAUX C, JUIN M, MANSUELLE P, GRANIER C. Fine molecular analysis of the antigenicity of the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin.II: A new antigenic epitope disclosed by pepsin method. *Mol. Immunol.* 1993; 30:1061-1068.
- DEVAUX C, CLOT-FAYBESSE O, JUIN M, MABROUK K, SABATIER JM, ROCHAT H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom usefulness of a synthetic non-toxic analog. *FEBS Lett.* 1997; 412(3):456-60
- DEVAUX C, CLOT-FAYBESSE O, PUGNIERE M, MANI JC, ROCHAT H, GRANIER C. A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high affinity monoclonal antibody and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *J Immun Methods* 2002; 271: 37-46.
- DINIZ CR. Chemical and pharmacological aspects of *Tityinae* venom. *Arthropod Venoms*. Bettini (Ed.), 1978. Springer-Verlag, Berlin. pp 379-394.
- FONTECILA-CAMPS JC, ALMASIY RJ, SUDDATH FL, WATT DD, BUGG CE. Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. USA* 1980;77:6496-6500.
- FRANK R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 1992; 48:9217-9232.

- FRANK R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports – principles and applications. *J Immunological Methods* 2002; 267: 13-26.
- FUKUHARA YDM, REIS ML, DELLALIBERA-JOVILIANO R, CUNHA FQC, DONADI EA. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 2003; 41:49-55
- GAZARIAN KG, GAZARIAN T, HERNÁNDEZ R, POSSANI LD. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine* 2005;23:3357-3368.
- GUATIMOSIM SC, PRADO VF, DINIZ CR, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS E. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxP: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 1999; 37: 507-517.
- GUATIMOSIM SC, KALAPOTHAKIS E, DINIZ CR, CHAVEZ-OLORTEGUI C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon* 2000; 38(1):113–21.
- HAMED MI. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *Intern J Antimicrobial Agents* 2003; 21: 170-174
- HASTE ANDERSEN P, NIELSEN M, LUND O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci.* 2006;15:2558-67.
- INCEOGLU B, LANGO J, JING J, CHEN L, DOYMAZ F, PESSAH IN, HAMMOCK BD. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as a alternative type of venom with distinct mechanism of action. *PNAS* 2003; 100:922-927

- ISMAIL M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 1995; 33:825-858
- JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT M, SCHLOMCHIK M. *Immunobiology*. 5a edição. 2001. Garland Science.
- KABSCH W, SANDER C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 1983; 22:2577-2637.
- KALAPOTHAKIS E, CHAVEZ-OLÓRTEGUI C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* 1997; 35:1523-1529
- KHARRAT R, ZEMOUAQI I, LASFAR ZB, MILED K, EL AYEB M. Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxin polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. *Toxicon* 1997; 35:915-929.
- KARBER C. Karber's method of determining LD₅₀ in: *Biological Standardization* (Ed. J.H. Burn) Oxford University Press 1937. London. pág. 37-40
- KRIFI MN, EL AYEB M, DELLAGI K. The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutic efficiency and cost. *J. Venom Anim Toxins* 1999; 5:
- KRIFI MN, SAVIN S, DEBRAY M, BON C, EL AYEB M, CHOUMET V. Pharmacokinetic study of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon* 2005; 45: 187-198.
- LAUNE L, MOLINA F, FERRIERES G, VLLARD S, BÉS C, RIEUNIER F, CHARDES T, GRANIER C. 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. Methods* 2002; 267:53-70.

- LESCAR J, RIOTTOT MM, SOUCHON H, CHITARRA V, BENTLEY GA, NAVAZA J, ALZARI PM, POLJAK RJ. Crystallization, preliminary X-ray diffraction study, and crystal packing of a complex between anti-hen lysozyme antibody F9.13.7 and guinea-fowl lysozyme. *Proteins* 1993; 15: 209-212
- LOURENÇO WR. The scorpion families and their geographical distribution. *J Venom Anim Toxins* 2001; 7
- LOURENÇO WR, CLOUDSLEY-THOMPSON JL, CUELLAR O, VON EICKSTEDT VRD, BARRAVIERA B, KNOX MB. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 1996 2:121-13
- LOURENÇO WR, CUELLAR O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1996; 1
- LUTZ A, MELLO O. Descrição de 5 espécies brasileiras dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. *Folha Médica* 1922;4:25-26.
- MACHADO DE ÁVILA RA, ALVARENGA LM, TAVARES CAP, MOLINA F, GRANIER C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon* 2004; 44:233-241
- MAMELAK AN, ROSENFELD S, BUCHOLZ R, RAUBITSCHKE 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. Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2006;24:3644-50.

- MANSUELLE P, MARTIN-EAUCLAIRE MF, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, DE LIMA MH, ROCHAT H, GRANIER C. The β -type toxin TsII from the scorpion *Tityus serrulatus*: amino acid sequence determination and assessment of biological and antigenic properties. *Natural Toxins* 1992;1 :119-125.
- MARIA WS, VELARDE DT, ALVARENGA LM, NGUYEN C, VILLARD S, GRANIER C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon* 2005; 46:210-217
- MARTIN-EAUCLAIRE M, CÉARD B, RIBEIRO AM, DINIZ CR, ROCHAT H, BOUGIS PE. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the south American scorpion *Tityus serrulatus*. *Federation of European Biochemists Society Letters* 1994; 342:181-184.
- MARTIN-EAUCLAIRE MF, ALAMI M, GIAMARCHI A, MISSIMILLI V, ROSSO JP, BOUGIS PE. A natural anatoxin, AmmVIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion α -toxins. *Vaccine* 2006; 24: 1990-1996.
- MEKI ARAM, HASAN HA, EL-DEEN ZMM, BAKAR S. Dysregulation of apoptosis in scorpion envenomed children: its reflection in their outcome. *Toxicon* 2003; 42:229-237.
- MENDES TM, MARIA WS, GRANIER C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS E. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. *Toxicon* . 2004; 4:617-624
- MERRIFIELD RB, Peptide synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 85:2149.

- MOREIRA-FERREIRA AM, KALAPOTHAKIS E, DINIZ CR, CHAVEZ-OLORTEGUI C. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon* 1998;36(2):333–9.
- NOVELLO JC, ARANTES EC, VARANDA WA, OLIVEIRA B, GIGLIO JR, MARANGONI S. TsTX-IV, a short chain four-dissulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom, which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Toxicon* 1999; 37:651-660
- OZKAN O, ADIGUZEL S, ATES C, BOZYIGIT I, FILAZI A. Optimization of antiscorpion venom production. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 2006; 12: 390-399
- PADILLA A, GOVEZENSKY T, POSSANI LD, LARRALDE C. Experimental envenoming of mice with venom from scorpion *Centruroides limpidus limpidus* : differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon* 2003;41:959-965
- PESSINI AC, TAKAO TT, CAVALHEIRO EC, VICHNEWSKI W, SAMPAIO SV, GILGIO JR, ARANTES EC. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 2001; 39: 1495-1504
- PESSINI AC, SANTOS DR, ARANTES EC, SOUZA GE. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*. 2006;48:556-66.
- PIMENTA AMC, STOCKLIN R, FAVREAU P, BOUGIS PE, MARTIM-EAUCCLAIR E MF. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15: 1562-1572

- POLIKARPOV I, JUNIOR MS, MARANGONI S, TOYAMA MH, TEPLYAKOV A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. J Mol Biol. 1999; 290:175-84.
- POSSANI LD, MARTIN BM, SVENDSEN I, RODE GS, ERICKSON BW. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*: Primary structure and sequence comparison by metric analysis. Biochem J 1985; 229: 739-750.
- POSSANI LD, MERINO E, CORONA M, BOLÍVAR F, BECERRIL B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion channels. Biochimie 2000; 82:861-868
- RAPBERGER R, LUKAS A, MAYER B. Identification of discontinuous antigenic determinants on proteins based on shape complementarities. J Mol Recognit. 2007;20:113-21.
- REINEKE U, SABAT R, MISSELWITZ R, WELFLE H, VOLK HD, SCHNEIDER-MERGENER J. A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. Nature Biotechnology 1999; 17: 271-275
- REINEKE U, KRAMER A, SCHNEIDER-MERGENER J. Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;243:23-36.
- REZENDE N, BORGES DIAS M, CAMPOLINA D, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, DINIZ CR, AMARAL C. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. Am. J. Trop. Med Hyg. 1995; 52:277-280.
- REZENDE NA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, AMARAL CFS. Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? Toxicon 1996; 34: 820-823

- RODRIGUEZ DE LA VEGA RC, POSSANI LD. Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon* 2004; 43: 865-875
- ROMERO NO, HERNANDEZ TJM. Cerebral edema associated to scorpion sting: a two-case sting report. *J Venom Anim Toxin Incl Trop Dis* 2005; 11: 594-600.
- SADLER K, ZENG W, JACKSON DC. Synthetic peptide epitope-based polymers: controlling size and determining the efficiency of epitope incorporation. *J Peptide Res* 2002; 60: 150-158
- SALI A, BLUNDELL TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993; 234:779-815.
- SCHUNK MK, MACALLUM GE. Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR Journal* 2005; 46:241-257.
- SHINNICK TM, SUTCLIFFE JG, GREEN N, LERNER RA. Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Ann. Rev. Microbiol.* 1983; 37:425-446.
- SOARES MRM, AZEVEDO CS, DEMARIA M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 359-363
- SRAIRI-ABID N, MANSUELLE P, MEJRI T, KAROUI H, ROCHAT H, SAMPIERI F, EL AYEB M. Purification, characterization and molecular modelling of two toxin-like proteins from the *Androctonus australis* Hector venom. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17):5614-20.
- SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN) E SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO (SES). Manejo integrado para prevenção da proliferação de vetores da dengue e leishmaniose e de escorpiões. *Rev Saúde Pública* 2007; 41: 317-320

- TEIXEIRA JR. AL, FONTOURA BF, FREIRE-MAIA L, MACHADO CRS, CAMARGO ERS, TEIXEIRA MM. Evidence of a direct action of a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on cardiac muscle. *Toxicon* 2001; 39: 703-709.
- THEAKSTON RDG, WARREL DA, GRIFFITHS E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 2003; 41: 541-557
- TORRES JB, MARQUES MGB, MARTINI RK, BORGES CVA. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Rev Saúde Pública* 2002; 36: 631-633
- TRAGGIAI E, PUZONE R, LANZAVECCHIA A. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine* 2003; 21:s2/35-s237
- VAN REGENMORTEL MHV. Mapping epitope structure and activity: from one-dimensional prediction for four-dimensional description of antigenic specificity. *Methods* 1996; 9: 465-472
- VAN REGENMORTEL MHV. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals* 2001; 29: 209-213
- VERDOLIN BA, FICKER SM, FARIA AMC, VAZ NM, CARVALHO CR. Stabilization of serum antibody responses triggered by inicial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz Jour Med Biol Res* 2001;34:211-219
- VON EICKSTEDT VRD, RIBEIRO LA, CANDIDO DM, ALBUQUERQUE MJ, JORGE MT. 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* 1996; 2: 92-105

WENSCHUH H, VOLKMER-ENGERT R, SCHIMIDT M, SCHULZ M, SCHNEIDER-MERGENER J, REINEKE U. Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* 2000; 55: 188-206

ZENOUAKI I, KHARRAT R, SABATIER JM, DEVAUX C, KAROUI H, VAN RIETSCHOTEN J, EL AYEB M, ROCHAT H. *In vivo* protection against *Androctonus australis hector* scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. *Vaccine* 1997; 15: 187-194