

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Estudo da toxina Ts1 nativa e recombinante
de *Tityus serrulatus* na produção de soro
neutralizante

ORIENTADO: Bárbara Bruna Ribeiro de Oliveira Mendes
ORIENTADOR: Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE
JUNHO 2012

Bárbara Bruna Ribeiro de Oliveira Mendes

**Estudo da toxina Ts1 nativa e recombinante
de *Tityus serrulatus* na produção de soro
neutralizante**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Orientador: Evanguedes Kalapothakis

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2012**

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

- **Departamento de Biologia Geral – ICB – UFMG**
- **Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG**
- **Departamento de Farmacologia – ICB – UFMG**
- **Fundação Ezequiel Dias – FUNED**
- **Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG**
- **Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq**
- **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – CAPES**

“Sonho que se sonha junto é realidade...”

Agradecimentos

Agradeço à Deus, por me permitir traçar este caminho e me sustentar em minhas dificuldades, sem o qual nada disso seria possível.

À minha família por todo suporte e apoio. Ao meu esposo Bráulio por ser tão compreensivo e companheiro, aos meus filhos Anna e Gabriel por serem minha inspiração e motivação, à minha mãezinha por existir, à Neuza por cuidar das minhas preciosidades e estar sempre disposta a ajudar em tudo. A todos meus familiares por sempre acreditarem que eu poderia vencer mais essa etapa de minha vida.

Ao longo desta jornada de trabalho tive a oportunidade de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas que só acrescentaram coisas boas em minha vida profissional.

Agradeço ao meu orientador Evanguedes Kalapothakis por contribuir para minha formação profissional, me conduzindo a um conhecimento científico respaldado por muita moral e profissionalismo. Por sua confiança e respeito, e por ser sempre um orientador muito presente em todas as etapas deste processo. Sou muito grata a você Evanguedes, e espero que este trabalho seja apenas o início de uma longa caminhada.

Aos meus queridos amigos do LBMM, por participarem deste processo junto comigo. Agradeço à Carol por ser muito mais do que qualquer amigo pode esperar, por sua dedicação e contribuição tão fundamentais a este trabalho, você é um tesouro que encontrei neste caminho. Ao Anderson por ser meu braço direito na Biologia molecular e à Érika por ser meu outro braço direito em tudo, obrigada por sempre poder contar com você. Agradeço a Flav's, Bella, Marcele, Tati, Barbarela, Adriana, Juliano, Lucilânia, e todas as outras pessoas que contribuíram com trabalho ou simples convivência, todos vocês são peças fundamentais na minha formação.

A todos os parceiros do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Ao professor Carlos Chavéz, Thaís, Clara, Sthefanny e Ricardo pela colaboração e parceria neste projeto. Ao professor Carlos Salas e ao Fábio por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos Laboratórios parceiros do Departamento de Biologia Geral e Farmacologia pelo suporte.

Agradeço aos amigos da FUNED, em especial Dra. Marta e Márcia, por terem me introduzido na pesquisa e serem reponsáveis também por minha formação profissional, por toda contribuição que vocês me deram e em especial pela amizade, carinho e respeito que me dedicam.

Aos profissionais que estiveram por trás deste trabalho, ao pessoal do CEBIO pela agilidade em fornecer os animais de experimentação, aos profissionais dos cemitérios municipais pelo auxílio na coleta dos escorpiões, ao CETEA e IBAMA pelas licenças concedidas, ao pessoal da manutenção do ICB, as secretárias do Laboratório e da Pós Graduação, enfim a todos envolvidos de alguma forma na execução deste trabalho.

A todos que sonharam e idealizaram junto comigo

Muito Obrigada

Sumário

Índice de Figuras	10
Índice de Tabelas	12
Lista de abreviaturas	13
Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	18
1.1 Escorpiões	18
1.1.1 Distribuição geográfica e classificação geral	18
1.1.2 Gênero <i>Tityus</i> : espécies peçonhentas no Brasil	20
1.1.2.1 <i>Tityus serrulatus</i>	23
1.2 O Escorpionismo no Brasil	26
1.2.1 Epidemiologia	26
1.2.2 Efeitos fisiopatológicos e manifestações clínicas do envenenamento escorpiônico	28
1.2.3 Tratamento do envenenamento escorpiônico	29
1.3 Composição da Peçonha Escorpiônica	30
1.3.1 Canais Iônicos e toxinas escorpiônicas	31
1.4 Mecanismo de ação das proteínas e peptídeos da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	34
1.4.1 Neurotoxinas com ação em canais para Na ⁺	35
1.4.1.1 β-Toxinas da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	38
1.4.1.2 α-Toxinas da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	42
1.4.2 Neurotoxinas com ação em canais para K ⁺	43
1.4.2.1 K ⁺ Neurotoxinas da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	44
1.4.3 Outras proteínas e peptídeos da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	45
1.5 Isolamento de toxinas da peçonha escorpiônica	48
1.6 Aplicações Biotecnológicas de toxinas escorpiônicas	53
1.6.1 Desenvolvimento de Terapias para o envenenamento	54
1.6.2 Ferramentas Farmacológicas em sistemas biológicos	56
1.6.3 Potenciais medicamentos	57
1.6.4 Potenciais inseticidas	58
1.7 Toxinas recombinantes	59
1.7.1 Toxina Ts1 recombinante	64
2. Objetivos	68
2.1 Objetivo Geral	68
2.2 Objetivos Específicos	68
3 Justificativa	70
4 Metodologia	74
4.1 Animais	74
4.2 Obtenção da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	74
4.3 Fracionamento da peçonha bruta de <i>Tityus serrulatus</i> e Purificação da toxina Ts1	75
4.4 Caracterização da fração XIV – Ts1	76

4.4.1	Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE.....	76
4.4.2	Determinação da massa molecular	77
4.5	Inserção de adaptadores a sequência da Ts1-4 e padronização da Reação em cadeia da polimerase (PCR)	77
4.6	Resolução Eletroforética em Gel de Agarose	78
4.7	Purificação de DNA a partir de gel de Agarose	79
4.8	Subclonagem do Produto de PCR da Ts1-4 ao vetor pGEM-T Easy.....	80
4.9	Eletrotransformação Bacteriana	80
4.10	PCR de Colônia	81
4.11	Extração Plasmidial por Lise Alcalina	82
4.12	Quantificação do DNA Plasmidial.....	83
4.13	Reação de Sequenciamento.....	83
4.14	Análises das sequências obtidas.....	85
4.15	Digestão com Enzima de Restrição BamHI.....	85
4.16	Ligação da sequência da Ts1-4 ao Vektor pET 11a.....	86
4.17	Seleção de colônias positivas para Ts1-4 em pET 11a.....	86
4.18	Verificação da fase de leitura dos clones positivos Ts1-4 em pET 11a	86
4.19	Sequenciamento dos clones em correta fase de leitura para Ts1-4 em pET 11a.....	87
4.20	Expressão piloto da toxina recombinante Ts1-4	88
4.21	Resolução Eletroforética SDS-PAGE da expressão piloto	89
4.22	Lise Bacteriana	90
4.23	Purificação da toxina recombinante Ts1-4.....	90
4.24	Tentativa de solubilização da toxina Ts1-4.....	91
4.25	Quantificação da toxina recombinante Ts1-4 por SDS-PAGE	91
4.26	Ensaio de Imunização	92
4.27	Sangria dos Coelhos.....	93
4.28	Preparação do Soro dos Coelhos.....	94
4.29	ELISA	94
4.30	Western Blot	95
4.31	Determinação da DL ₅₀	96
4.32	Soroneutralização.....	97
5	Resultados	99
5.1	Fracionamento da peçonha bruta de <i>Tityus serrulatus</i> e purificação da toxina Ts1.....	99
5.2	Caracterização da fração XIV – Ts1	100
5.2.1	Eletroforese em gel SDS-PAGE.....	100
5.2.2	Determinação da massa molecular	101
5.3	Toxina Ts1 recombinante.....	102
5.3.1	Inserção de adaptadores a sequência da Ts1-4 e padronização da PCR	102
5.3.2	Purificação do DNA da toxina Ts1-4 a partir de gel de agarose.....	104
5.3.3	PCR de colônia – pGEM-T Easy com inserto Ts1-4.....	105
5.3.4	Sequenciamento da ligação da sequência da Ts1-4 no vetor pGEM-T Easy-	107
5.3.5	Digestão com enzima de restrição Bam HI	110
5.3.6	Seleção de colônias positivas para Ts1-4 em vetor de expressão pET 11a.....	111

5.3.7 Verificação da fase de leitura dos clones TS1-4 em pET 11a por PCR de colônia	113
5.3.8 Sequenciamento dos clones Ts1-4 em pET 11a em correta fase de leitura	114
5.3.9 Expressão piloto da toxina Ts1-4	115
5.3.10 Purificação da toxina Ts1-4 recombinante	118
5.3.11 Tentativa de solubilização da toxina recombinante Ts1-4 em DMSO	119
5.3.12 Quantificação da toxina recombinante por SDS-PAGE	120
5.3.13 Titulação e reatividade dos soros obtidos na Imunização	122
5.3.14 Western Blot	127
5.3.15 Determinação da DL ₅₀ da peçonha bruta de <i>Tityus serrulatus</i> e da toxina Ts1 nativa	129
5.3.15.1 Determinação da DL ₅₀ da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i>	129
5.3.15.2 Determinação da DL ₅₀ da toxina Ts1 nativa de <i>T. serrulatus</i>	129
5.3.16 Soroneutralização	130
6 Discussão	134
7 Conclusão	143
8 Perspectivas	144
Referências Bibliográficas	145

Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição Geográfica de alguns gêneros da família Buthidae	19
Figura 2: Classificação de escorpiões do gênero <i>Tityus</i>	20
Figura 3: Escorpião da espécie <i>Tityus bahiensis</i>	21
Figura 4: Escorpião da espécie <i>Tityus cambridgei</i>	22
Figura 5: Escorpião da espécie <i>Tityus stigmurus</i>	22
Figura 6: Escorpião da espécie <i>Tityus trivittatus</i>	23
Figura 7: Escorpião da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	24
Figura 8: Áreas externas de imóveis propícios à ocorrência e proliferação de escorpiões	24
Figura 9: Mapa de distribuição geográfica de <i>Tityus serrulatus</i> no Brasil	26
Figura 10: Aparato de veneno dos escorpiões	30
Figura 11 – Modelo bidimensional da proteína (subunidade α) do canal para sódio dependente de voltagem.....	36
Figura 12: Estrutura tridimensional da toxina Ts1 de <i>T. serrulatus</i>	39
Figura 13: Seqüência do cDNA do precursor da Ts1	40
Figura 14: Perfil cromatográfico da fração solúvel da peçonha de <i>T. serrulatus</i> fracionada e CM-celulose-52.....	51
Figura 15: Perfil cromatográfico de RP-HPLC, em coluna C18, da fração X resultante do fracionamento da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> em CM-celulose-52.....	53
Figura 16: Sequenciamento da Ts1-4 em pGEM-T Easy	65
Figura 17: Esquema da construção da toxina recombinante Ts1-4	66
Figura 18: Cromatografia do extrato bruto da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> em CM-cellulose-52 pH 7,8.	100
Figura 19: Análise da fração XIV obtida pelo fracionamento do extrato bruto da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> em CM-cellulose-52 por PAGE com agentes desnaturantes	101
Figura 20: Espectro de massa da fração XIV	102
Figura 21: Inserção de adaptadores à seqüência da Ts1-4 por PCR.....	103
Figura 22: Purificação da banda referente à seqüência da Ts1-4.....	105
Figura 23: PCR de colônia – inserto da Ts1-4 em vetor pGEM-T Easy.	106
Figura 24: Sequenciamento clone 3 – Ts1-4 em pGEM-T Easy	108
Figura 25: Sequenciamento clone 6 – Ts1-4 em pGEM-T Easy	109
Figura 26: Sequenciamento clone 7 – Ts1-4 em pGEM-T Easy	109
Figura 27: Digestão com enzima de restrição BamHI do vetor pGEM-T Easy Ts1-4.	110
Figura 28: PCR de colônia para seleção de colônias positivas de Ts1-4 em vetor de expressão pET 11a.	112
Figura 29: PCR de colônia para seleção de colônias positivas para Ts1-4 em vetor de expressão pET 11a	113
Figura 30: Sequenciamento clone 32 – Ts1-4 em pET 11a.....	115
Figura 31: Expressão piloto da toxina recombinante Ts1-4 a partir do clone 23	116
Figura 32: Expressão piloto da toxina recombinante Ts1-4 a partir do clone 32	117
Figura 33: Purificação da toxina recombinante Ts1-4.....	118
Figura 34: Gel SDS-PAGE tentativa de solubilização da Ts1-4 em DMSO	119
Figura 35: Gel SDS-PAGE quantificação da toxina recombinante Ts1-4.....	121

Figura 36: ELISA de reatividade Peçonha bruta X Soros diversos	123
Figura 37: ELISA de reatividade Ts1 nativa X Soros diversos	124
Figura 38: ELISA de reatividade Ts1-4 recombinante X Soros diversos.....	125
Figura 39: ELISA de reatividade Proteínas bacterianas X Soros diversos	126
Figura 40: Western blot de reconhecimento dos soros frente aos antígenos	128
Figura 41: Gráfico da soroneutralização dos diversos soros contra 2 DL50 da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i> e da toxina Ts1 nativa.....	131

Índice de Tabelas

Tabela 1: Dados epidemiológicos do escorpionismo no Brasil entre os anos de 2000 e 2010	26
Tabela 2: β -Toxina de <i>T. serrulatus</i>	38
Tabela 3: α -Toxinas de <i>T. serrulatus</i>	42
Tabela 4: K ⁺ Neurotoxinas de <i>T. serrulatus</i>	44
Tabela 5: Outras proteínas e peptídeos de <i>T. serrulatus</i>	45
Tabela 6: Iniciadores utilizados para a inserção de adaptadores a construção da Ts1-4	77
Tabela 7: Sequências dos iniciadores utilizados para reação de seqüenciamento dos clones em pGEM-T Easy	84
Tabela 8: Sequência dos iniciadores Ts1 direto e reverso	87
Tabela 9: Sequências dos iniciadores utilizados para reação de seqüenciamento dos clones em pET 11a.87	
Tabela 10: Estratégias de expressão dos clones da Ts1-4	89
Tabela 11: Esquema de Imunização dos coelhos com a toxina recombinante Ts1-4, toxina Ts1 nativa e peçonha bruta de <i>Tityus serrulatus</i>	93
Tabela 12: Doses da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i> utilizadas para determinação da DL50 em camundongos, fator de 1.3.....	96
Tabela 13: Doses da toxina Ts1 nativa de <i>T. serrulatus</i> utilizadas para determinação da DL50 em camundongos, fator de 1.3.....	97
Tabela 14: Determinação da DL ₅₀ da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i> : doses e mortes	129
Tabela 15: Determinação da DL ₅₀ da toxina Ts1 nativa de <i>T. serrulatus</i> : doses e mortes	130
Tabela 16: Soroneutralização da Peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i>	131
Tabela 17: Soroneutralização da toxina Ts1 nativa de <i>T. serrulatus</i>	132

Lista de abreviaturas

°C	Graus Celsius
Amp	Ampicilina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovino
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DL50	Dose letal de 50%
DNA	Ácido dexosirribonucléico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato
DTT	Ditiotritol
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
Kb	Quilobase
kDa	Quilo Dalton
LacY1	Gene que codifica a permease
LacZ	Gene que codifica a β-galactosidase
Lb	Meio de Cultura Luria-Bertani
M	Molar
mAb	Anticorpo monoclonal
MBP	Proteína ligadora de maltose
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
mg	Mili-grama
mL	Mililitro
mM	Mili-Molar
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
ORF	Open reading frame (fase de leitura aberta)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	Tampão salina fosfato Tween 20
PBST	Tampão salina fosfato Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	<i>Phenilmetilsulfonil fluoride</i>
PSA	Persulfato de Amônio
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
q.s.p	Quantidade Suficiente Para

RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
T4 DNA ligase	DNA ligase do bacteriófago
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq DNA polimerase	DNA polimerase termoestável do <i>Thermus</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade de enzima
U.V.	Ultra Violeta
UniProt	<i>The Univesal Protein Resourse</i>
V	Volts
x-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose
μ F	microFaraday
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
Ω	Ohms

Resumo

São notificados, em vários países, a alta morbidade e mortalidade, especialmente em crianças, devido à picadas de escorpiões. *Tityus serrulatus*, considerado o escorpião mais perigoso no Brasil, produz um veneno potente e sua picada representa uma ameaça grave à saúde pública. A toxina Ts1 do escorpião amarelo *T. serrulatus* é uma β -neurotoxina que atua em canais para Na^+ . É a principal toxina da peçonha e apresenta grande importância no processo de envenenamento. O nosso grupo está envolvido na pesquisa de novos imunógenos da peçonha de *Tityus serrulatus* e vem buscando entender melhor a produção de anticorpos neutralizantes a fim de desenvolver um soro anti-escorpiônico mais específico e eficaz. Neste contexto, o presente estudo propõe avaliar o potencial imunogênico da toxina Ts1 da peçonha de *T. serrulatus* através da produção de soro neutralizante a partir de sua forma nativa e recombinante (com quatro cópias em tandem – Ts1-4). Para isso, a toxina Ts1 nativa foi purificada da peçonha bruta por processo de cromatografia líquida de troca catiônica. A toxina recombinante Ts1-4 foi expressa em sistema pET, sob a forma de corpos de inclusão. Coelhos foram imunizados com estes imunógenos e o soro obtido foi avaliado quanto a seu poder de neutralização frente a peçonha bruta. Foi observado que o soro produzido contra a toxina Ts1 nativa possui anticorpos neutralizantes capazes de proteger *in vivo* 25% dos animais desafiados com 2 DL_{50} da peçonha bruta de *T. serrulatus*. O soro produzido contra a toxina recombinante Ts1-4 possui anticorpos neutralizantes que protegeram *in vivo* 100% dos animais desafiados com 2 DL_{50} da toxina nativa e 12,5% dos animais desafiados com 2 DL_{50} da peçonha bruta de *T. serrulatus*. O avanço mais importante obtido a partir deste trabalho foram as informações acerca da capacidade de produção de anticorpos que neutralizam a toxina Ts1 nativa, que ainda não tinha sido estudado neste contexto. Os resultados descritos neste trabalho reforçam a importância da geração de novos imunógenos para produção de um melhor soro anti-escorpiônico.

Abstract

High morbidity and mortality rates due to scorpion envenomation are notified in many countries, especially involving children. *Tityus serrulatus* is considered the most dangerous scorpion in Brazil. It produces a powerful venom and its sting represents a grave threat to public health. Ts1 is the main venom toxin and it is very important in the process of envenomation. Our group is engaged in the research of new *T. serrulatus* venom immunogens, aiming towards a better understanding of neutralizing antibodies production to develop a more specific and effective antiscorpionic serum. In this context, the present study proposes to evaluate the immunogenic potential of Ts1 toxin from *T. serrulatus* venom through the production of neutralizing serum from its native and recombinant form (four copies in tandem, Ts1-4). Therefore the native Ts1 toxin was purified from the crude venom using a cation exchange liquid chromatography process. Ts1-4 recombinant toxin was expressed in the pET system, forming inclusion bodies. Rabbits immunized with the cited immunogens and the neutralizing power of the obtained serum was evaluated against crude venom. The anti-native Ts1 serum has neutralizing antibodies capable of protecting 25% of animals challenged with 2 DL₅₀ of *T. serrulatus* crude venom. The anti-Ts1-4 serum has neutralizing antibodies capable of protecting 100% of animals challenged with 2 DL₅₀ of native Ts1 and 12,5% of animals challenged with 2 DL₅₀ of *T. serrulatus* crude venom. The most important progress was the information about the production of serum containing neutralizing antibodies against native Ts1, which had not been accessed yet. The results of this work reinforce the importance of yielding new immunogens to improve antiscorpionic serum production.

Introdução

1. Introdução

1.1 Escorpiões

1.1.1 Distribuição geográfica e classificação geral

Os escorpiões são organismos interessantes devido a seu tempo de evolução, sua importância médica e a presença, em sua peçonha, de uma grande variedade de componentes biologicamente ativos, principalmente toxinas que interagem com canais iônicos e são nocivas a vários organismos, inclusive ao homem.

Os primeiros escorpiões surgiram na Terra há cerca de 450 milhões de anos. Apesar do grande tempo de existência, esses animais apresentam morfologia conservada, de modo que a diversificação taxonômica desse grupo não foi acompanhada por nenhuma grande revolução na arquitetura corporal. Esses animais apresentam ampla distribuição geográfica e são encontrados na maioria dos habitats terrestres (florestas tropicais, pradarias, savanas, florestas temperadas, cavernas e até mesmo montanhas cobertas de neve), estando ausente apenas na Antártida. Isso se deve a uma série de adaptações, incluindo baixa perda de água cutânea, atividade noturna e a baixa taxa metabólica que estes organismos apresentam. Assim, o grande sucesso desses artrópodes está relacionado à plasticidade e adaptabilidade da sua história de vida, ecologia, fisiologia e comportamento (Polis, 1990).

Os escorpiões pertencem à classe Arachnida, ordem Scorpionidae que compreende 6 superfamílias, divididas em 13 famílias que por sua vez compreendem 55 gêneros e aproximadamente 1600 espécies e subespécies. Entre as famílias de escorpiões mais exploradas, destaca-se a Buthidae, por apresentar todas as 25 espécies potencialmente perigosas ao homem distribuídas em quatro subfamílias: *Isometrinae*, *Buthinae*, *Centrurinae* e *Tityinae* (Bürchel, 1971).

A família Buthidae compreende aproximadamente 500 espécies, das quais os diferentes gêneros possuem distribuição bastante diversificada. Por exemplo, *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* e *Heterometrus* estão localizados no Velho Mundo,

principalmente no norte da África, Oriente Médio e Índia. O gênero *Parabuthus* é encontrado no sul da África, o *Centruroides* está distribuído na região dos Estados Unidos, México e América Central, e o gênero *Tityus* em Trinidad e Tobago e América do Sul, principalmente Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (Figura 1) (Possani *et al.*, 1999).



Figura 1: Distribuição Geográfica de alguns gêneros da família Buthidae. *Androctonus*, *Leirus*, *Buthus* e *Heterometrus* estão presentes no norte da África, Oriente Médio e Índia. *Parabuthus* no sul da África, *Centruroides* na região dos Estados Unidos, México e América Central e *Tityus* em Trinidad e Tobago, Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. Representação: Bárbara Mendes

As espécies de escorpião mais peçonhentas são *Buthotus tamulus* da Índia, *Leirus quinquestriatus* e *Androctonus crassicauda* do Norte da África e Oriente Médio, *Tityus serrulatus* do Brasil e *Centruroides suffusus* do México (Simard & Watt, 1990).

1.1.2 Gênero *Tityus*: espécies peçonhentas no Brasil

No Brasil, onde existem cerca de 160 espécies de escorpiões, as responsáveis pelos acidentes graves pertencem ao gênero *Tityus* que tem como característica, entre outras, a presença de um espinho sob o ferrão (Ministério da Saúde Brasil, 2009).

Os representantes do gênero *Tityus* responsáveis por acidentes com humanos no Brasil são *Tityus serrulatus*, o mais importante, seguido por *T. bahiensis* e *T. stigmurus*. À medida que aumenta o número de notificações, espécies como *T. obscurus* e *T. trivittatus* começam a se configurar como importantes causadoras de acidentes (Ministério da Saúde Brasil, 2009). A classificação dos escorpiões do gênero *Tityus* está representada na Figura 2.

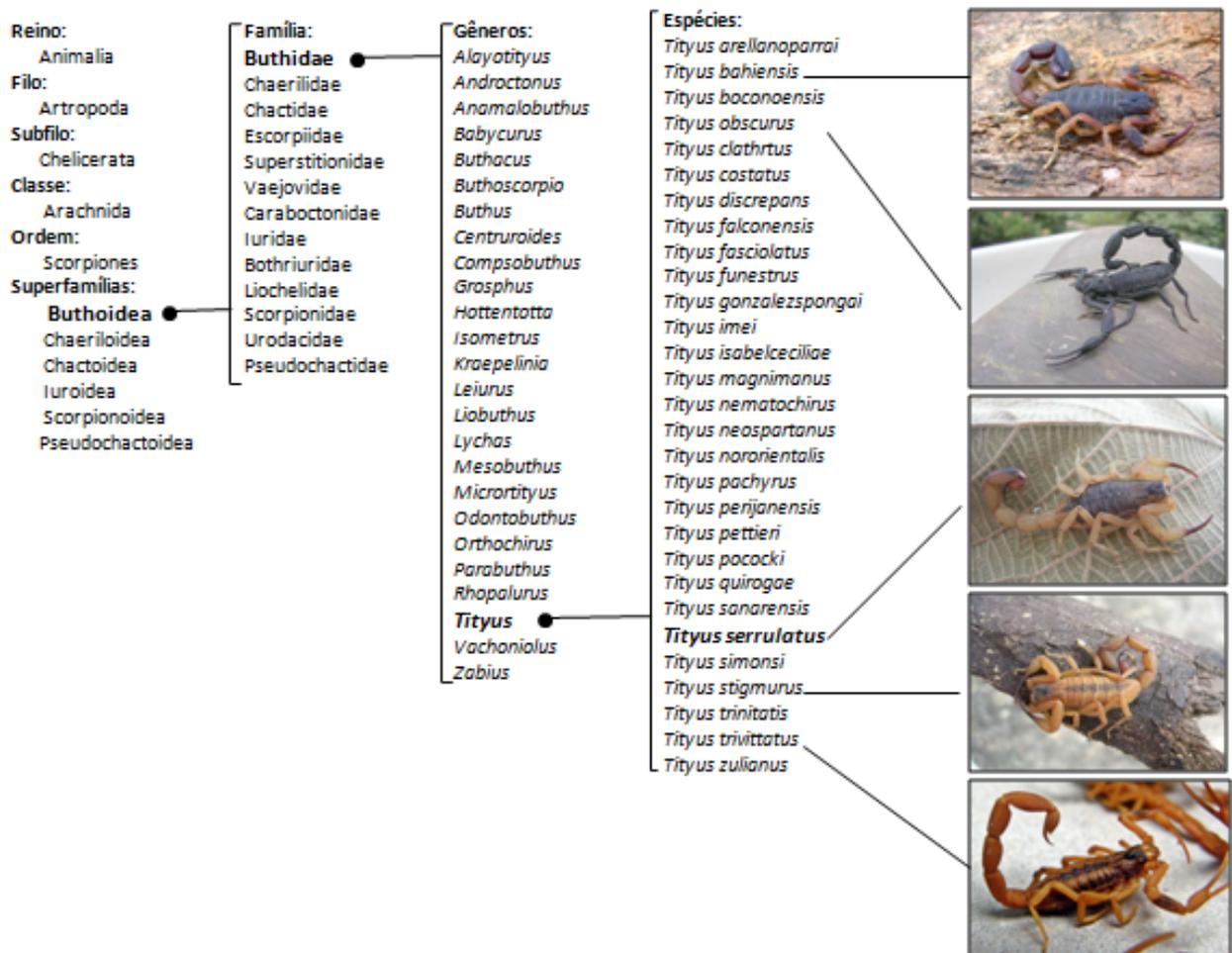


Figura 2: Classificação de escorpiões do gênero *Tityus*, responsável pela maior incidência de escorpionismo no Brasil e pelos casos de maior gravidade. Destaque para as espécies *T. bahiensis*, *T. cambridgei*, *T. serrulatus*, *T. stigmurus*, e *T. trivittatus*, representantes do gênero de importância médica no Brasil. Fonte: Marcussi et al. (2011), adaptado por Bárbara Mendes.

Tityus bahiensis (Perty, 1833), conhecido como escorpião marrom, possui corpo e cauda de coloração marrom escuro, às vezes até avermelhada e pernas marrom alaranjadas com manchas em um marrom mais escuro. O macho apresenta mãos bem dilatadas (Figura 3). Pode ser encontrado no Sul, Sudeste, parte do Centro-Oeste e Nordeste, limitando-se aos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Trata-se de uma espécie nativa da cidade de São Paulo, sendo o escorpião que causa acidentes mais frequentes nesta capital, contudo os acidentes raramente são fatais, mesmo para crianças (Bucarety *et al.*, 1995). Em 2010 foram registrados 6790 acidentes por escorpiões em São Paulo sendo que apenas um caso evoluiu para óbito (Ministério da Saúde Brasil, 2012).

Figura 3: Escorpião da espécie *Tityus bahiensis*. Popularmente conhecido como escorpião marrom e responsável por acidentes graves principalmente no estado de São Paulo. Fonte: <http://fiocruz.br>



Tityus obscurus (Guerrero-Vargas, 2012), popularmente conhecido como escorpião preto, apresenta coloração totalmente negra (Figura 4). Ocorre na região amazônica, principalmente no Pará e Amapá. É considerada espécie sinônima de *Tityus paraensis* (Kraepelin, 1896) (Lourenço *et al.*, 2008). O macho apresenta uma cauda e os palpos mais longos e finos que o da fêmea. Há poucos relatos de acidentes com essa espécie, contudo sua peçonha vem sendo extensivamente estudada por alguns pesquisadores. Atualmente, encontram-se depositadas no banco de dados 41 toxinas desta peçonha, com grande destaque para toxinas bloqueadoras de canais para potássio ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid184226\[Organism:noexp\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid184226[Organism:noexp])) (Acesso 23/04/2012).



Figura 4: Escorpião da espécie *Tityus cambridgei*. Popularmente conhecido como escorpião preto e habitante da região amazônica. Fonte: <http://venomlist.com>

Tityus stigmurus (Thorell, 1876) conhecido como escorpião amarelo do Nordeste, assemelha-se ao *T. serrulatus* nos hábitos e na coloração, porém apresenta uma faixa escura longitudinal na parte dorsal do seu mesossoma, seguido de uma mancha triangular no prossoma (Figura 5). É a espécie que causa mais acidentes no Nordeste, presente em Pernambuco, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte e Sergipe. A maioria dos envenenamentos é considerado leve com ausência de letalidade das vítimas (Silva *et al.*, 2000)



Figura 5: Escorpião da espécie *Tityus stigmurus*. Conhecido como escorpião amarelo do Nordeste. Fonte: <http://pinoypetfinder.com>

Tityus trivitattus (Kraepelin, 1898), apresenta coloração amarelo-escuro ou marrom claro, com três faixas longitudinais quase negras (Figura 6). Distribui-se por

quase toda região Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, sendo encontrado no Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. Habita regiões urbanizadas e sua moradia estende-se por galerias de esgoto, buracos, fossas e esconderijos subterrâneos. Acidentes com essa espécie são pouco notificados, embora seja uma das espécies mais importantes do ponto de vista médico. A inoculação da peçonha causa dor intensa na região da picada, os quadros de susceptibilidade aguda podem ser acompanhados de hipertensão, problemas psicomotores e taquicardia. O envenenamento raramente resulta em morte do paciente, casos fatais encontram-se associados principalmente a pessoas com problemas cardíacos. O escorpionismo na Argentina é produzido por *T. trivittatus* (Parma, 2006)



Figura 6: Escorpião da espécie *Tityus trivittatus*. Fonte: <http://incaudavenenum.e-monsite.com>

1.1.2.1 *Tityus serrulatus*

Tityus serrulatus (Lutz e Mello Campos, 1922), popularmente conhecido como escorpião amarelo, é a espécie brasileira de maior importância médico-científica. Apresenta coloração amarelo claro com tronco, dedos e último segmento da cauda escuros (Figura 7). O nome desta espécie refere-se a uma serrilha de 3 a 5 dentes que possuem no quarto segmento da cauda (Barraviera, 1999).

Considerado o escorpião mais peçonhento da América do Sul (Bucaretschi *et al.* 1994; Cupo *et al.* 1994; Eickstedt *et al.* 1994; Freire-Maia *et al.* 1994), é o escorpião causador de acidentes graves, principalmente no estado de Minas Gerais.



Figura 7: Escorpião da espécie *Tityus serrulatus*. O escorpião de maior importância médico-científica do Brasil. Fonte: <http://aracnohobbybrasil.blogspot.com>

Embora primitivamente habitante do cerrado e de campos abertos, *Tityus serrulatus* tornou-se bem adaptado à vida domiciliar urbana. Principalmente pelas condições oferecidas por moradias humanas, com grandes possibilidades de abrigo, como lixo, entulho, pilhas de tijolos e telhas, e uma alimentação farta como baratas e outros insetos (Figura 8) (Bucherl, 1979; Likes *et al.*, 1984). A falta de competidores e predadores, como macacos, quatis, siriemas, sapos e rãs, também permite a rápida proliferação de escorpiões, uma vez que esses dois fatores contribuem decisivamente para o controle populacional da espécie (Bertazzi, 2007).



Figura 8: Áreas externas de imóveis propícios à ocorrência e proliferação de escorpiões com empilhamento de madeira, tijolos, telhas; terreno baldio e frestas em paredes e janelas. Fonte: Ministério da Saúde Brasil, 2009.

A distribuição inicial deste escorpião compreende a região Sudeste do país. Entretanto, devido a sua rápida capacidade de reprodução e adaptabilidade em ambientes urbanos, *T. serrulatus* pode ser encontrado em vários estados brasileiros como Minas Gerais, Bahia, Ceará, Pernambuco, Sergipe, Piauí, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Mato grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Tocantins, Distrito Federal, Paraná Santa Catarina e mais recentemente, alguns registros foram relatados para casos isolados no Rio Grande do Sul (Figura 9) (Ministério da Saúde Brasil, 2009; Bortoluzzi *et. al.*, 2007; Torres *et. al.*, 2002; Borges *et. al.*, 2010).

Um fator importante para a rápida disseminação deste animal é seu modo de reprodução. Escorpiões desta espécie se reproduzem por partenogênese, com gestação de aproximadamente 3 meses, nascendo em média, 20 filhotes por ninhada (Lourenço *et al.*, 1994). A ausência de machos e de reprodução sexuada na população confere alto sucesso reprodutivo para as fêmeas, que podem rapidamente promover a ocupação de qualquer ambiente no qual se encontrem.



Figura 9: Mapa de distribuição geográfica de *Tityus serrulatus* no Brasil. Ampla distribuição geográfica da espécie *T. serrulatus* pelo território brasileiro, evidenciando a grande capacidade de ocupação de ambientes diversos. Fonte: Carmo, 2011.

1.2 O Escorpionismo no Brasil

1.2.1 Epidemiologia

Os acidentes por animais peçonhentos foram recentemente reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doenças não atendidas ou negligenciadas, que afetam milhões de pessoas pobres, sendo uma manifestação evidente das desigualdades prevalentes em saúde.

O acidente escorpiônico é o de maior número de notificações no Brasil: em 2010 foram 50.126 acidentes, com 88 óbitos. A incidência foi de 26,3 acidentes/100.000 habitantes, e a letalidade foi de 0,2%. Não há uma distinção significativa entre o sexo afetado. A faixa etária com mais registros foi a entre 20 e 49 anos, com 47,6%. Crianças entre 1 e 9 anos estão na faixa etária com maior quantidade de óbitos (39/88), principalmente naqueles que, na vigência do quadro sistêmico, recebem atendimento 6 horas ou mais após a picada (Ministério da Saúde Brasil, 2012).

Tabela 1: Dados epidemiológicos do escorpionismo no Brasil entre os anos de 2000 e 2010. De maneira geral, o número de óbitos, o número de casos e a incidência dos mesmos aumentaram ao longo dos anos.

Critério	Região	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Óbitos por acidentes por escorpiões	Norte	1	1	3	2	1	3	5	5	6	6	6
	Nordeste	13	21	25	15	16	12	13	33	47	32	46
	Sudeste	1	19	23	31	22	29	9	25	32	54	32
	Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Centro-oeste	1	2	6	3	3	4	1	3	2	5	3
	Brasil	16	43	57	51	42	48	28	66	87	97	88
Incidência de casos (100.000 hab)	Norte	3,2	5,1	7,0	10,0	11,4	13,0	13,6	13,1	15,3	17,9	15,4
	Nordeste	16,3	17,6	21,3	21,2	26,3	31,6	36,9	37,8	36,3	43,7	45,1
	Sudeste	5,2	10,7	13,6	15,0	17,7	20,2	18,1	17,3	20,7	24,8	25,6
	Sul	0,3	1,5	1,7	1,8	2,1	2,5	2,8	3,5	3,7	3,6	4,1
	Centro-oeste	5,3	6,2	7,4	7,1	9,9	10,5	10,2	8,4	10,9	14,0	14,7
	Brasil	7,5	10,6	13,0	13,8	16,8	19,5	20,1	20,0	21,5	25,7	26,3
Casos de acidentes	Norte	418	680	947	1.380	1.603	1.917	2.043	2.015	2.318	2.742	2.444
	Nordeste	7.802	8.515	10.402	10.478	13.132	16.142	19.051	19.746	19.276	23.416	23.929
	Sudeste	3.791	7.887	10.093	11.276	13.546	15.836	14.416	13.921	16.599	20.102	20.572
	Sul	81	373	431	479	540	677	765	980	1.010	1.011	1.114
	Centro-oeste	612	733	891	873	1.245	1.366	1.349	1.136	1.490	1.941	2.067
	Brasil	12.704	18.188	22.764	24.486	30.066	35.938	37.624	37.798	40.693	49.212	50.126

Tabela adaptada a partir dos dados fornecidos pelo site do Ministério da Saúde 2012 http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1537.

A partir da implantação da notificação dos acidentes escorpiônicos no país, em 1988, vem se verificando um aumento significativo no número de casos. A Tabela 1 mostra um aumento de 12.704 casos notificados no ano 2000 para 50.126 casos notificados no ano de 2010. O maior número de notificações é proveniente das regiões Nordeste e Sudeste, contudo, sabe-se que muitos acidentes não são notificados.

Esses acidentes costumam ocorrer com maior frequência nos meses mais quentes e chuvosos, entre outubro e março, mas a variação anual é pequena. A região com maior número de acidentes é a Nordeste (23.929), seguida pela região Sudeste (20.572). O estado onde ocorrem mais registros é Minas Gerais (12.016), seguido da Bahia (8.910) e São Paulo (6.790) (Ministério da Saúde Brasil, 2012). Nestes três estados as espécies de escorpiões mais recorrentes são *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*, sendo o primeiro o grande responsável pelos acidentes de maior gravidade.

Escorpiões adaptam-se facilmente aos grandes centros urbanos (62,2% dos acidentes ocorreram na zona urbana), sendo encontrados em todas as capitais. Os locais do corpo onde mais ocorrem picadas são os dedos das mãos e os pés (23,9% e 21,5%, respectivamente). A maioria dos acidentes escorpiônicos é considerado leve (83,8%), não

sendo indicada soroterapia nesses casos (em 17,7% dos acidentes houve administração de soroterapia) (Ministério da Saúde Brasil, 2012).

1.2.2 Efeitos fisiopatológicos e manifestações clínicas do envenenamento escorpiônico

O efeito tóxico da peçonha varia em função de alguns fatores, como a espécie do escorpião, a dose inoculada, a capacidade e o estado fisiológico das glândulas do veneno, o peso, a idade e o estado de saúde da vítima, sua sensibilidade específica e o local da picada. Os sintomas do envenenamento escorpiônico se iniciam logo após a picada, tendo sido relatados desde dores locais a alterações sistêmicas graves (Hering *et al.*, 1992).

Com base nas manifestações clínicas, os acidentes podem ser classificados em leves, moderados e graves. Os leves apresentam somente sintomatologia local, representada por dor e, eventualmente, parestesia. Os moderados apresentam além da dor local, sialorréia e sintomas cardio-respiratórios como agitação, sonolência, sudorese, náuseas, vômitos, hipertensão arterial, taquicardia e taquipnéia. Os quadros graves diferenciam-se dos moderados por apresentarem uma ou mais manifestações do tipo bradicardia sinusal, bloqueio atrioventricular total, insuficiência cardíaca congestiva, choque, edema pulmonar agudo e convulsões, sendo que, em casos extremos, a vítima pode chegar ao coma e à morte (Amaral e Rezende, 1990).

O edema pulmonar agudo é a complicação mais grave e a principal causa de óbito induzido pelo envenenamento escorpiônico. A patogênese do edema pulmonar causada pela peçonha escorpiônica é decorrente de dois mecanismos, um cardiogênico e outro não cardiogênico, sendo este último, consequência do aumento da permeabilidade vascular e da ativação da cascata inflamatória. (Amaral *et al.*, 1993; Pessini *et al.*, 2003).

Todos estes efeitos tem sido explicados pela liberação de neurotransmissores colinérgicos (Vital Brazil *et al.*, 1973) e adrenérgicos (Corrado *et al.*, 1968), associada à estimulação das supra-renais, subsequente liberação maciça de adrenalina (Celeste Henriques *et al.*, 1968) e ações reflexas (Freire-Maia *et al.*, 1989).

1.2.3 Tratamento do envenenamento escorpiónico

O tratamento visa neutralizar o mais rápido possível a toxina circulante, combater os sintomas do envenenamento e dar suporte às condições vitais do paciente. Todas as vítimas de picada de escorpião, mesmo que o quadro seja considerado leve, devem ficar em observação hospitalar nas primeiras 4 a 6 h após o acidente, principalmente as crianças. Nos casos moderados, recomenda-se, pelo menos, 24 a 48 h de observação e, nos casos graves, com instabilidade dos sistemas cardiorrespiratórios, está indicada a internação com monitorização contínua dos sinais vitais (Cupo *et al.*, 2003).

Tratamento Sintomático

O combate à dor deve ser realizado sempre, pois constitui motivo de inquietação e angústia, agravando o estado geral. Podem ser utilizados analgésicos por via oral ou parenteral, dependendo da intensidade da dor. O combate à dor, como medida única adotada, é geralmente suficiente para todos os casos leves e, em adultos, para a maioria dos acidentes moderados (Cupo *et al.*, 2003).

Tratamento Específico

O soro antiescorpiónico (ou antiaracnídico) está formalmente indicado em todos os casos graves. Nos moderados, é utilizado principalmente em crianças abaixo de sete anos, por constituírem grupo de risco. Para os demais, deve-se inicialmente combater a dor e manter o paciente sob observação e, a qualquer sinal de agravamento do quadro, iniciar a soroterapia. É importante ressaltar que a gravidade do quadro já se manifesta dentro da primeira ou da segunda hora após acidente. A dose de soroterapia, preconizada nos Manuais de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos é de 2-3 ampolas para os casos moderados e 4-6 para os casos graves (Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 1998), por via intravenosa, sem diluição, durante 15 a 30 min, e a dose é a mesma para crianças e adultos (Cupo *et al.*, 2003).

Assim, o tratamento consiste na observação das manifestações clínicas para todos os casos e administração do soro antiescorpiónico para os casos moderados e graves. A eficácia do tratamento está diretamente relacionada com a rapidez em que o soro é

administrado, uma vez que este neutraliza apenas as toxinas circulantes. (Rezende *et al.*, 1998). Foi verificado melhora das condições do paciente após a administração do soro, porém, alterações cardiorrespiratórias causadas por toxinas já absorvidas podem persistir por vários períodos de tempo (Cupo *et al.*, 1994).

1.3 Composição da Peçonha Escorpiônica

A composição da peçonha de escorpiões pode variar dependendo da área habitada e dos hábitos alimentares (Watt e Simard, 1984). Em geral, a peçonha é uma mistura complexa de proteínas básicas, peptídeos e outros componentes menores, tais como, açúcares, sais, serotonina e histamina, inibidores de protease, mucopolissacarídeos, proteases, hialuronidase, fosfolipase A2 e fosfoesterases podem também estar presentes, embora eles pareçam desempenhar um papel menor no envenenamento. É geralmente conhecido que venenos de escorpião são particularmente ricos em proteínas pequenas, principalmente neurotoxinas e peptídeos capazes de interagir especificamente com vários canais iônicos em membranas de células excitáveis (Cologna *et al.*, 2009)



Figura 10: Aparato de veneno dos escorpiões. Destaque para o télson , de forma bulbar, onde estão presentes as glândulas de veneno e para o aguilhão por onde a peçonha é inoculada. Fonte: <http://mzufba.ufba.br>

A peçonha escorpiônica pode ser obtida por estimulação elétrica do télson do animal ou maceração da glândula de veneno. É o resultado da secreção de um par de glândulas de origem tegumentar situadas no télson, este tem forma bulbar que termina no aguilhão responsável pela inoculação da peçonha (Figura 10). A peçonha é uma substância mucosa, opalescente e com aspecto leitoso (Diniz; Gonçalves, 1956, 1960). É parcialmente solúvel em água e pode ser fracionada por centrifugação, obtendo-se uma fração insolúvel, constituída por mucoproteínas e restos de membranas, e uma fração

solúvel contendo os outros compostos da peçonha, com destaque para as neurotoxinas.

As neurotoxinas são os principais componentes da peçonha de escorpião e têm como objetivo biológico o ataque e a imobilização de presas, mas também desempenha papel importante na defesa contra predadores (Bosmans e Tytgat, 2007). Peçonhas de escorpião são fontes de diferentes classes de peptídeos que afetam a função normal de canais iônicos. Elas alteram a permeabilidade iônica de células excitáveis, através da interação específica com canais para Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Cl^- dependentes de voltagem, alterando o mecanismo de ativação dos mesmos e levando a intensa despolarização e liberação massiva de neurotransmissores (Ismail, 1995; Gordon *et al.*, 1998; Possani *et al.*, 1999). Estes peptídeos têm sido intensivamente estudados, pois representam excelentes ferramentas para investigar a contribuição fisiológica de canais iônicos para a célula e o comportamento de órgãos e, para sondar e correlacionar a estrutura e função do canal iônico (Hille, 1992; Catterall, 1995; Garcia *et al.*, 2001; Lewis; Garcia, 2003)

1.3.1 Canais Iônicos e toxinas escorpiônicas

Sinais elétricos controlam a contração muscular, secreção de hormônios, sensações provenientes do ambiente, processamento de informações no cérebro e sua saída do cérebro para os tecidos periféricos. Nas células excitáveis, sinais elétricos também têm influência importante no metabolismo intracelular, transdução de sinal, expressão gênica, síntese e degradação proteica (Yu; Catterall, 2004).

A excitabilidade elétrica é uma das propriedades mais importantes e característica dos neurônios. A maioria das células de invertebrados mantém grandes gradientes iônicos através de sua membrana superficial. O fluido intracelular contém uma alta concentração de íons potássio e baixa concentração de íons sódio e cálcio, comparado ao fluido extracelular. Esses gradientes são mantidos pela ação de bombas iônicas dependentes de energia específica para Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Além disso, essencialmente todas as células de vertebrados mantêm um potencial de membrana internamente negativo (-60 mV a -90 mV), visto que suas membranas são especificamente permeáveis ao K^+ e permitem que o mesmo saia da célula mais rapidamente que o Na^+ ou Ca^{2+} possam entrar (Marcussi *et al.*, 2011).

As células nervosas e musculares são eletricamente excitáveis devido à presença, em sua membrana superficial, de canais iônicos sensíveis a voltagem formados por proteínas transmembrana, que são seletivos para Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Esses canais se abrem e se fecham em função da voltagem da membrana, permitindo um movimento rápido de íons apropriados em função de seus gradientes de concentração, de forma que correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, despolarizando ou hiperpolarizando a membrana. Os canais para sódio, potássio e cálcio são responsáveis pelos sinais elétricos necessários para a geração e condução do potencial de ação (Marcussi *et al.*, 2011).

Os potenciais de ação são conduzidos pelo axônio até o terminal nervoso, causando despolarização da terminação pré-sináptica, que por sua vez, induz a abertura transitória de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem. O Ca^{2+} do fluido intersticial flui a favor do gradiente de potencial eletroquímico para dentro da terminação do axônio. O aumento da concentração interna de Ca^{2+} causa a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática e a liberação de neurotransmissor na fenda sináptica por exocitose. O neurotransmissor, então, difunde através da fenda sináptica e liga-se aos receptores específicos, na superfície externa do neurônio seguinte ou de células efetoras tais como as de músculo esquelético (Marcussi *et al.*, 2011). Alguns trabalhos já descreveram toxinas escorpiônicas capazes de ativar e inibir canais específicos a esse íon (Valdivia, *et al.*, 1992; Zamudio *et al.*, 1997).

Toxinas escorpiônicas bloqueadoras de canais para cloro (clorotoxina) também foram isoladas. Debin *et al.* (1993) isolaram um peptídeo de 37 aminoácidos estabilizado por 4 pontes dissulfeto, cuja seqüência demonstrou semelhança com toxinas para insetos de baixa massa molecular. Estudos *in vivo* demonstraram que essa toxina é capaz de paralisar insetos e crustáceos, provavelmente por uma ação em receptores para glutamato do sistema nervoso desses artrópodes.

Os canais para Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} contribuem, cada um da sua forma, para o processo de transmissão em células excitáveis. Devido à sua importância em muitos aspectos da regulação celular e transdução de sinais, os canais iônicos dependentes de voltagem são alvos moleculares de uma grande diversidade de toxinas, incluindo as que alteram a cinética e a dependência de voltagem de sua ativação e inativação (Catterall *et al.*, 2007).

Toxinas que interagem seletivamente com canais para Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} são ferramentas fundamentais para o entendimento da base molecular da excitabilidade elétrica. Sob este ponto de vista, uma grande variedade de toxinas naturais tem sido extensivamente estudada por farmacologistas, fisiologistas e bioquímicos devido à sua interação com canais específicos de membranas excitáveis (Catterall *et al.*, 2007).

A neurotransmissão química no sistema nervoso central é um processo constituído de vários eventos que envolvem a síntese e liberação de neurotransmissores, a difusão dos mesmos na fenda sináptica e a ligação a receptores, resultando em alterações das propriedades elétricas das células pós-sinápticas (Bauerfeind *et al.*, 1995).

Os canais para sódio sensíveis à voltagem são componentes importantes no mecanismo de neurotransmissão. Estes canais desempenham um importante papel na geração de potenciais de ação de neurônios (Massenssini *et al.*, 2003). A chegada do potencial de ação no terminal sináptico desencadeia a abertura de canais iônicos sensíveis à voltagem. A consequente despolarização da célula, resultante do aumento na permeabilidade ao sódio, causa alteração conformacional nos canais para cálcio dependentes de voltagem, tornando-os ativos e, portanto, permeáveis a este íon. O resultado dessa ativação é o influxo maciço de íons cálcio para o interior da célula (Bauerfeind *et al.*, 1995).

A liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica é um dos eventos celulares desencadeados pelo íon cálcio. Após abertura dos canais para cálcio e influxo do mesmo para o interior da célula, há a mobilização das vesículas sinápticas (Langley e Grant, 1997). Essas vesículas liberam seu conteúdo (neurotransmissores) na fenda sináptica por exocitose. Uma vez liberados, os neurotransmissores se difundem pela fenda podendo interagir com autorreceptores da membrana pré-sináptica, inibindo sua liberação, ou com receptores pós-sinápticos, gerando potenciais pós-sinápticos inibitórios ou excitatórios.

A ação de um neurotransmissor pode ser finalizada por degradação enzimática, por recaptação ou ambos. A recaptação é o processo ativo que retira o neurotransmissor da fenda sináptica. É realizada por proteínas transportadoras altamente específicas, presentes em neurônios pré e pós-sinápticos, células gliais, corpos celulares neuronais, terminais nervosos e dendritos, para que a ação sináptica do mediador seja finalizada (Bear *et al.*, 1996). Este transporte tem a dependência absoluta de íons sódio e pode

ocorrer de forma reversa, dependendo das condições iônicas (Rossi *et al.*, 2000).

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais importante e também o mais abundante do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (Fonnum, 1984). É liberado de vesículas sinápticas contidas nos terminais nervosos por exocitose clássica dependente de íons cálcio. A neurotransmissão glutamatérgica está envolvida em diversas funções fisiológicas, como os processos de aprendizagem e a formação da memória (Bliss e Collingridge, 1993). O mecanismo de recaptção do glutamato é fundamental para prevenir sua excitotoxicidade, causada por uma elevação dos seus níveis normais (Gegelashvili e Schousboe, 1997; Danbolt, 2001), cuja ação descontrolada pode levar à morte neuronal (Lent, 2004).

O GABA (ácido γ -aminobutírico) é o mais predominante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (Enna e Snyder, 1975; Delorey, *et al.*, 1993), encontrado em altas concentrações no encéfalo e na medula espinhal (Krogaard-Larsen *et al.*, 1998). É um neurotransmissor que atua na abertura de canais iônicos e essa ação pode ocorrer em nível pré ou pós-sináptico, produzindo efeitos inibitórios. Ele distribui-se por muitas regiões do cérebro, participando da regulação de várias funções no SNC.

Neurotoxinas escorpiônicas, por aumentarem a permeabilidade da membrana ao sódio, são capazes de induzir ou inibir a liberação e a captação de neurotransmissores de diferentes preparações (Nicolato *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstraram que a toxina TsTX (Ts3), classificada como α -toxina, evoca a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de cérebros de ratos (Fletcher *et al.*, 1996). Cecchini *et al.* (2006), verificaram que a toxina TsTX-V (Ts5) é capaz de inibir a captação de dopamina e GABA em preparações de sinaptossomas corticais de ratos. A redução da captação da dopamina e do GABA pode ser devida à despolarização induzida pela entrada de sódio, como consequência de uma ação da toxina TsTX-V (Ts5) nos canais para Na^+ sensíveis à voltagem.

1.4 Mecanismo de ação das proteínas e peptídeos da peçonha de *T. serrulatus*

Está demonstrado que os principais efeitos induzidos pela peçonha de *T. serrulatus* são devidos às ações das toxinas em sítios específicos dos canais para sódio, com subsequente despolarização das células excitáveis do organismo. Em decorrência disso, há liberação maciça de catecolaminas e acetilcolina pelas terminações nervosas pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático, bem como da medula adrenal, as quais, atuando em diferentes setores do organismo, são responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas observados no envenenamento (Marcussi *et al.*, 2011). As toxinas que atuam em canais para potássio têm pouca importância toxicológica, todavia, associadas a toxinas que atuam em canais para sódio, agem de forma sinérgica, propiciando potente ação tóxica à peçonha (Gwee *et al.*, 2002).

1.4.1 Neurotoxinas com ação em canais para Na⁺

Canais para Na⁺ dependentes de voltagem são proteínas transmembrana que funcionam como uma passagem de permeabilidade seletiva de Na⁺ através de membranas biológicas. Deste modo, eles são peças fundamentais para a geração e propagação de potenciais de ação em neurônios e células eletricamente excitáveis. Consistem de uma principal α -subunidade formadora de poros (aproximadamente 260 kDa), que pode ser associada com até quatro β -subunidades (30-40 kDa), dependendo do tecido e espécie. Nove isoformas de α -subunidades (Nav1.1 - Nav1.9) têm sido identificadas (Catterall *et al.*, 2005; Yu; Catterall, 2003)

As α -subunidades são compostas de quatro domínios homólogos (I-IV), contendo cada uma seis segmentos α -hélices transmembranares (1-6) e um laço de revestimento de poro localizado entre as hélices 5 e 6. O segmento 4 de cada domínio é altamente carregado positivamente e desempenha um papel chave na ativação do canal. Acredita-se ser um sensor de tensão. O laço curto intracelular ligando domínios III e IV, serve como portão de inativação (Figura 11) (Yu e Catterall, 2003; Denac *et al.*, 2000; Bosmans e Tytgat, 2007)

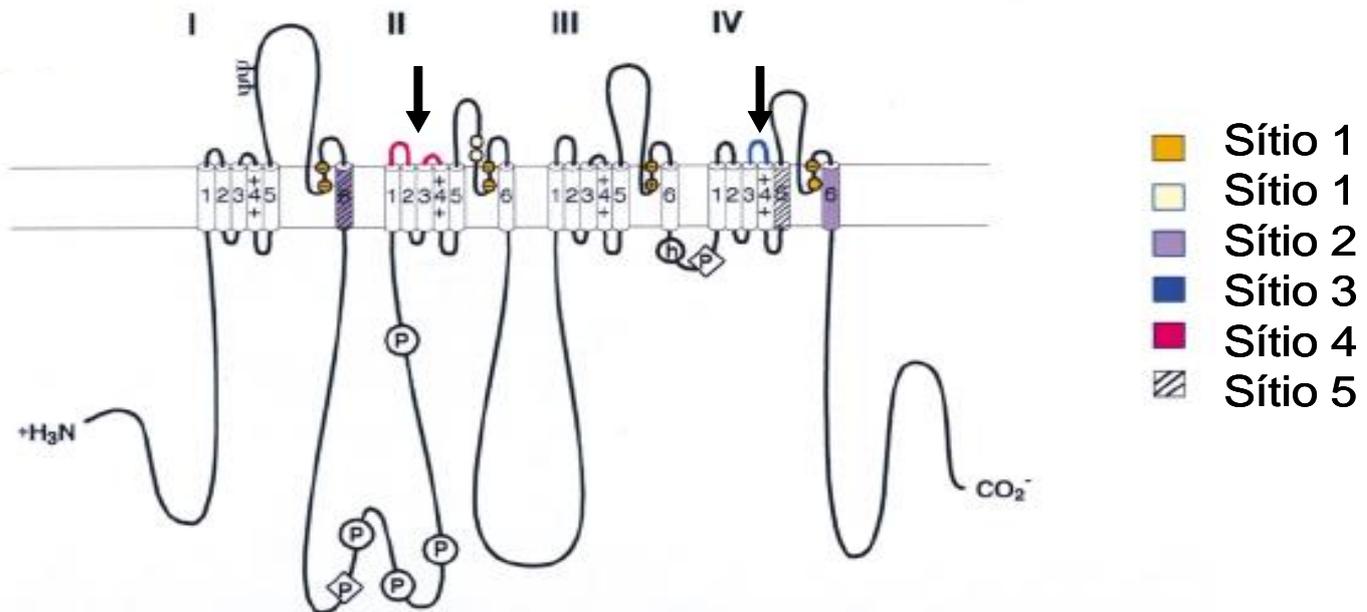


Figura 11 – Modelo bidimensional da proteína (subunidade α) do canal para sódio dependente de voltagem. Os cilindros representam as α -hélices transmembranas. Os domínios homólogos I a IV estão identificados. As hélices 4 marcadas com sinais positivos, atuam como sensores de voltagem e os movimentos dessas hélices são responsáveis pela ativação do canal. A alça intracelular que conecta os domínios III e IV funciona como portão de inativação, deslocando-se para o poro do canal logo após a despolarização, bloqueando a condução dos íons. O filtro de seletividade é formado pela parte da alça extracelular que conecta as hélices 5 e 6 e mergulha na membrana como “alça do poro”. Estão evidenciados os principais sítios de interação de toxinas. Sítio 3 (azul) ligam-se α -toxinas escorpionicas e sitio 4 (vermelho) ligam-se as β -toxinas escorpionicas. Fonte: Marcussi *et al.*, 2011.

Canais para Na^+ dependentes de voltagem são componentes cruciais para a atividade de vida das células. São alvos moleculares para uma ampla gama de neurotoxinas que atuam em seis ou mais sítios de receptores distintos na proteína do canal, alterando significativamente a sua função (Cestéle e Catterall, 2000). Toxinas que atuam nesses canais são as proteínas mais reativas e as principais agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos do envenenamento escorpionic (Rodríguez de la Veja e Possani, 2005). São consideradas peptídeos de cadeia longa e podem ser classificadas em duas classes: α e β -neurotoxinas escorpionic (Jover *et al.*, 1980; Gordon *et al.*, 1998). Um terceiro grupo, chamado γ -toxinas, inclui toxinas altamente específicas contra insetos que são distintas das α e β -toxinas em sua sequência de aminoácidos, ação e local de ligação no canal para Na^+ (Lester *et al.*, 1982; Zlotkin *et al.*, 1985; 1991).

α -Toxinas escorpionic constituem uma família de proteínas relacionadas tanto estruturalmente quanto funcionalmente. São compostas por 60 a 70 resíduos de

aminoácidos, estabilizados por 4 pontes dissulfeto, com um núcleo denso altamente conservado formado por uma α -hélice e duas a três folhas β pregueadas como motivo estrutural, estabilizados por meio de pontes de dissulfeto (Housset *et al.*, 1994). Estas toxinas foram classificadas quanto a sua toxicidade específica contra mamíferos e células de insetos. Aquelas que mostram uma maior afinidade com canais para Na^+ de células de mamíferos são conhecidas como clássicas α -toxinas; aquelas com uma maior afinidade para os canais de insetos são α -toxinas anti-insetos, e aquelas capazes de se ligar em ambos os tipos de canais são nomeados α -like toxinas.

α -Toxinas se ligam ao sítio 3 das hélices extracelulares 3-4 do IV domínio dos canais para Na^+ dependentes de voltagem, diminuindo assim o bloqueio ou mecanismo de inativação destes canais (Figura 11). Tais toxinas evitam a translocação externa ou o movimento do segmento 4 durante a fase de despolarização, imobilizando o sensor de voltagem na posição externa. Assim, elas diminuem ou retardam a inativação e prolongam a fase de repolarização do potencial de ação, sem afetar o processo de ativação (Fontecilla-Camps *et al.*, 1988).

β -Toxinas são compostas por 60 a 65 resíduos de aminoácidos e ligam-se no sítio 4 dos canais para Na^+ dependentes de voltagem, mais especificamente, na hélice extracelular dos segmentos 3-4 do domínio II (Figura 11). Durante a ativação destes canais, os sensores de voltagem são translocados externamente, permitindo assim a interação da β -toxina com a porção extracelular do segmento, imobilizando-a e, mantendo-a na posição ativada. β -toxinas induzem um deslocamento na ativação do canal para sódio dependente de voltagem na direção hiperpolarizada e uma redução na amplitude do pico de corrente de sódio, produzindo espontâneos e repetitivos potenciais de ação (Cestèlle e Catterall, 2000; Jonas *et al.*, 1986; Cestèlle *et al.*, 1998).

As seqüências de aminoácidos de α e β -toxinas mostram um variável grau de identidade (Possani *et al.*, 1982). Há vários resíduos estritamente conservados na estrutura primária de toxinas que atuam em canais para Na^+ dependentes de voltagem, incluindo oito cisteínas que formam as pontes dissulfeto (Oren *et al.*, 1998). A interação entre tais toxinas e o canal ocorre através da superfície hidrofóbica composta de resíduos de aminoácidos aromáticos e alifáticos (Sun *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). A lisina na posição 1 da Ts1 tem sido considerada importante para a elevada toxicidade exibida por esta toxina. A modificação química de Lys1 ou clivagem dos primeiros seis resíduos de

Ts1 resulta numa notável perda de atividade (Possani *et al.*, 1985). Alguns testes de toxicidade e de afinidade de ligação têm mostrado que os resíduos de Trp54 e Trp30, do conservado aglomerado aromático, e Lys12 são importantes para a atividade da Ts1 (Hassani *et al.*, 1999). A modificação química destes resíduos reduz a afinidade aparente dessa toxina com o canal de Na⁺.

1.4.1.1 β -Toxinas da peçonha de *T.serrulatus*

É conhecida apenas uma β -toxina na peçonha de *T. serrulatus*, a Ts1, que está completamente caracterizada com relação a estrutura e efeitos eletrofisiológicos (Marcussi *et al.*, 2011).

Ts1

A Ts1 também chamada de TsTX-I; toxina γ ; Toxin T2-IV; Toxin Ts7; Ts VII; Toxin VII; TsTX-VII; Tityustoxin VII; Toxin III-10; Toxin II-11, é a toxina majoritária da peçonha, representando aproximadamente 15% da peçonha solúvel (Pessini *et al.*, 2001) e foi a primeira toxina quimicamente caracterizada da peçonha. É muito potente e interessante, visto que interage com o sítio receptor 4 de canais para Na⁺ e é tóxica tanto para mamíferos quanto para insetos (Barhaning *et al.*, 1982; 1983; 1984; Jonas *et al.*, 1986).

Tabela 2: β -Toxina de *T. serrulatus*

Nome	Outros nomes	Sequência	Massa Molec.	pI	Ação
Ts1 β -NaTx	TsTX-I; toxin β ; Toxin T2- IV; Toxin Ts7; Ts VII; Toxin VII; TsTX-VII; Tityustoxin VII; Toxin III-10; Toxin II-11	KEGYLMDHEGCKLSCFI RPSGYCGRECGIKKGSS GYCAWPACYCYGLPNW VKVWDRATNKC	6890.9	8.67	Alteração da modulação dos canais para Na ⁺ , mantendo-os na posição ativada. (Castélle e Catterall, 2000)

Fonte: Cologne *et al.*, 2009. Adaptado por Bárbara Mendes

A Ts1 é responsável por muitos efeitos do envenenamento por *T. serrulatus*. Apresenta DL₅₀ intravenosa de apenas $76 \pm 9 \mu\text{g/Kg}$ e induz intensa liberação de catecolaminas, com concomitante aumento da pressão arterial (Arantes *et al.*, 1989; Vasconcelos *et al.*, 2005).

A sua estrutura foi determinada por cristalografia de raios X (Figura 12) mostrando um núcleo denso altamente conservado formado por três fitas β antiparalelas e uma α hélice interligadas por quatro pontes dissulfeto. Curiosamente, a alça hidrofóbica I na molécula da Ts1 é mais curta do que em todas as outras β -toxinas e tem o mesmo comprimento da alça presente em α -toxinas. No entanto, a sua orientação é significativamente diferente da encontrada nas α -toxinas. Sua alça II tem o mesmo comprimento e a mesma orientação espacial observada para a alça correspondente nas α -toxinas (Polikarpov *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 2003). A análise estrutural indica que as posições de íons de fosfato marcam plausíveis sítios de ligação ao canal para Na^+ (Pinheiro *et al.*, 2003).

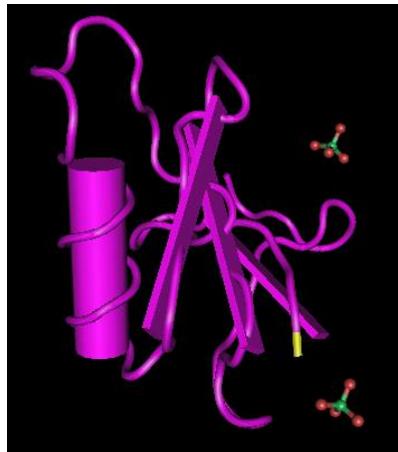


Figura 12: Estrutura tridimensional da toxina Ts1 de *T. serrulatus*. Pode-se identificar a formação de três fitas β antiparalelas e uma α hélice. O ponto amarelo sinaliza o início da toxina, um resíduo de lisina (K). Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=22164>

Com o advento da Biologia Molecular, as principais toxinas da peçonha foram clonadas e tiveram seu gene amplificado do DNA genômico. Ts1 é sintetizada como um precursor de 252 pares de base codificando 84 aminoácidos, dos quais 20 pertencem ao peptídeo sinal, este e os últimos 3 resíduos C-terminais são removidos pós-

traducionalmente (Martin-Eauclaire *et al.*, 1992). A Figura 13 mostra o cDNA e a sequência de aminoácidos da Ts1. A toxina madura apresenta massa molecular de 6.890,9 Da e pI 8,67 (Cologna *et al.*, 2009).

CGAAGAACAATCGATCTGAACG	ATG	AAA	GGA	ATG	ATC	TTG	TTT	ATT	AGC	TCC	TTA	TTG	58					
	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	-9					
CTG	ATC	GGC	ATT	GTC	GTA	GAA	TGT	AAA	GAA	GGT	TAT	CTC	ATG	GAT	CAC	GAA	GGT	112
<u>L</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	10
TGC	AAA	CTT	AGT	TGC	TTT	ATC	AGA	CCA	TCG	GGA	TAC	TGC	GGC	AGA	GAA	TGC	GGA	166
C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	G	28
ATT	AAA	AAG	GGC	TCA	TCG	GGC	TAT	TGC	GCC	TGG	CCC	GCG	TGT	TAC	TGC	TAC	GGG	220
I	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	46
CTT	CCA	AAT	TGG	GTG	AAA	GTT	TGG	GAT	AGA	GCG	ACG	AAC	AAA	TGT	GGC	AAA	AAA	274
L	P	N	W	V	K	V	W	D	R	A	T	N	K	C	G	K	K	64
TAA	ATTTGTTTCGCTGAAAATCCTTTACAAATGAACTGTAATAAGTTTGGCAAAAATATAAAAATGTTTC																	343
*																		65

Figura 13: Sequência do cDNA do precursor da Ts1. Sequência de nucleotídeos do cDNA que codifica o precursor da Ts1, o peptídeo sinal está sublinhado, o stop códon está designado com um asterisco. Fonte: Martin-Eauclaire *et al.*, 1992.

No que diz respeito a sua ação no organismo a toxina Ts1 é amplamente caracterizada:

Trabalho realizado por Jonas *et al.* (1986), em fibras nervosas mielinizadas isoladas do nervo tibial de *Xenopus laevis*, demonstrou que a Ts1 (700 nmol/L) reduziu a amplitude do potencial de ação de 109 mV para 52 mV e aumentou sua duração de 1,25 ms para 4,5 ms; despolarizou a membrana e induziu atividade espontânea que cessou em poucos minutos. Na concentração de 440 nmol/L, induziu fluxo de Na⁺ para o interior da célula no potencial de repouso, mas reduziu a permeabilidade máxima ao Na⁺ em aproximadamente 20%. Os resultados obtidos para Ts1 foram diferentes dos obtidos para outras β-toxinas escorpiônicas, sugerindo que ela apresenta um efeito mais evidente na cinética da inativação do canal para Na⁺.

Ts1 ativa os macrófagos e estimula a liberação de interleucinas IL-1a, IL-1b, IL-6 e fator de necrose tumoral (Petricevich *et al.*, 2007, 2008). Induz relaxamentos transitórios do corpo cavernoso isolado de coelho pela liberação de óxido nítrico a partir de nervos nitrérgicos (de Oliveira *et al.*, 2003).

Bertazzi *et al.*, 2003 evidenciou que o aumento da atividade lítica do soro de ratos, induzido pela peçonha ou toxina Ts1, é dependente do sistema complemento. Estes resultados mostram que o sistema complemento está envolvido no processo inflamatório induzido pela peçonha ou toxina e, conseqüentemente, no edema pulmonar, hemólise, leucocitose, entre outras manifestações clínicas de envenenamento grave.

A injeção intravenosa de Ts1 pode induzir uma inibição, rápida intensa e sustentada de esvaziamento gástrico 0,25-48 h após o envenenamento (Bucarechi *et al.*, 1999). Doses subletais de injeção intravenosa (Ts1, 20 µg/kg) para ratos causam, 30-180 min após a injeção, a hiperglicemia, aumentos estatisticamente significativos nos níveis séricos de aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase, bem como um elevado nível de ácidos graxos livres no plasma e um baixo nível de glicogênio do fígado (Corrêa *et al.*, 1997).

Ts1 evoca liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de ratos (Massensini *et al.*, 1998). Induz a liberação de dopamina exocitótica [3H] em fatias corticais pré-frontais do cérebro de ratos, devido à mobilização de cálcio dos estoques intracelulares de cálcio sensíveis ao IP3 (Fernandes *et al.*, 2004). Induz a liberação de acetilcolina em sinaptossomas cerebrocortical de ratos (Falqueto *et al.*, 2002) e a liberação de GABA em fatias de cérebro de rato (Fernandes *et al.*, 2001).

Em ratos conscientes sem restrições, Ts1 induz liberação de catecolaminas e aumento longo, intenso e duradouro da pressão arterial média (Vasconcelos *et al.*, 2005). Em músculo retrator do pênis de ratos, Ts1 causa relaxamento atuando sobre os nervos inibitórios (Bomfim *et al.*, 2005). Em átrio isolado de rato, Ts1 induziu uma redução da taxa de força contrátil, seguido por aumento da força e da redução da taxa e, finalmente, por redução tanto da taxa quanto da força. O aumento da força contrátil era um efeito adrenérgico e a redução da taxa foi devido à liberação de acetilcolina a partir de terminações vagais (Couto *et al.*, 1992).

Ts1 causou um aumento concentração e tempo - dependente da liberação de noradrenalina e adrenalina de células medulares adrenais cromafins de bovinos (Conceição *et al.*, 1998). No coração isolado de cobaia, Ts1 induziu efeitos complexos, os quais foram divididos em 3 fases: uma fase inicial (taquicardia ou bradicardia associada com um aumento na força contrátil), uma fase intermediária (oscilações de taxa cardíaca,

força contráctil e fluxo coronário) e uma terceira fase (taquicardia). Estes efeitos foram devido à libertação simultânea de acetilcolina e catecolaminas a partir de fibras nervosas pós-ganglionares no coração (Silveira *et al.*, 1991).

1.4.1.2 α -Toxinas da peçonha de *T. serrulatus*

Foram isoladas e bem caracterizadas até o momento apenas três α -toxinas da peçonha de *T. serrulatus*: Ts2, Ts3 e Ts5 (Marcussi *et al.*, 2011). Kalapothakis e Chávez-Olórtegui (1997) sugeriram que a letalidade da peçonha está diretamente relacionada com o nível de expressão de α -toxinas.

Tabela 3: α -Toxinas de *T. serrulatus*

Nome	Outros nomes	Sequência	Massa Molec.	pI	Ação
Ts2 α - NaTx	TsTX-III; III-8; Tst2; Toxin II; TsTX-II; Tityustoxin II; Toxin T1-IV; beta toxin TsII	KEGYAMDHEGCKFSCFI RPAGFCGDGYCKTHLKAS SGYCAWPACYCYGVDP HIKVWDYATNKC	6998.0	7.70	Inibição da inativação dos canais para Na ⁺ . (Cologna <i>et al.</i> , 2012)
Ts3 α - NaTx	TsTX; Tityustoxin; Toxin IV-5 TsIV-5; Ts IV alpha toxin; Ts IV; Toxin-4; Tityustoxin IV; Toxin IV; Ts III; Toxin-3;	KKDGYPVEYDNCAIYIC WNYDNAYCDKLCCKDK KADSGYCYWVHILCYC YGLPDSEPTKTNGKC	7240.1	5.62	Inibição da inativação dos canais para Na ⁺ . (Martin-Euclaire <i>et al.</i> , 1994)
Ts5 α - NaTx	TsTX-V; Tityustoxin-5; Tityustoxin V; alpha toxin TsTX-V; Ts V; Toxin V	KKDGYPVEGDNCAFAC FGYDNAYCDKLCCKDKK ADDGYCVWSPDCYCYG LPEHILKEPTKTSGRC	7200.1	5.14	Inibição da inativação dos canais para Na ⁺ . (Arantes <i>et al.</i> , 1994)

Fonte: Cologna *et al.*, 2009. Adaptado por Bárbara Mendes

1.4.2 Neurotoxinas com ação em canais para K⁺

Os canais para potássio são provavelmente o tipo mais antigo de canal iônico e está amplamente distribuído nos seres vivos, de bactérias a seres humanos. Eles estão presentes em todas os tipos de tecidos e células e são parte de uma grande variedade de processos biológicos. Além disso, eles estão envolvidos em um grande número de patologias humanas (Shieh *et al.*, 2000)

Canais para potássio são excepcionalmente diversificados, tanto em estrutura como em função. Células individuais podem expressar vários tipos de canais para K⁺. Por exemplo, uma única célula neuronal do hipocampo pode exibir 6 ou mais condutâncias distintas ao K⁺, que influenciam a excitabilidade (Castle *et al.*, 1989).

Os canais para K⁺ podem ser divididos em dois grandes grupos: os canais dependentes de voltagem e os dependentes de ligantes. Devido à alta seletividade para íons K⁺ e à ampla distribuição nos tecidos, os canais para K⁺ são muito importantes em vários processos fisiológicos, tais como excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios, regulação da secreção de fluidos e ativação de linfócitos, dentre outros (Tytgat *et al.*, 1999). Possuem grande heterogeneidade, pelo menos 8 famílias de genes de subunidade alfa foram clonadas e identificadas, cada uma dessas famílias contém um grande número de membros individuais, em um total de mais de 60 diferentes subunidades (Robbins, 2001).

Estudos têm demonstrado o efeito da peçonha de escorpião também em canais para potássio. Já foram purificadas e sequenciadas várias toxinas peptídicas das peçonhas tais como a caribdotoxina, que está sendo usada como ferramenta específica para bloquear canais para potássio de alta condutância ativados por cálcio (KvCa); a noxiustoxina, que bloqueia canal para K⁺ retificador tardio e a iberiotoxina do *Buthus tamulus*, dentre outras (Carbone *et al.*, 1982; Gimenez-Gallego *et al.*, 1988; Galvez *et al.*, 1990).

A maioria das toxinas escorpiônicas específicas para canais de potássio (KTx) são pequenos peptídeos básicos com cerca de 23 – 43 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 ou 4 pontes dissulfeto. Estudos estruturais sobre KTx revelaram uma conservada

estrutura tridimensional composta de uma α - hélice conectada por duas pontes dissulfeto a uma estrutura de três fitas de folha β no motivo $\alpha\beta$ DB. Uma terceira ponte de dissulfeto liga a folha β em uma seção alargada na porção amino-terminal da toxina. Apesar da sua semelhante arquitetura, KTx exibe distinta seletividade e afinidade para uma variedade de canais de K^+ (Rodriguez de la Veja *et al.*, 2003) . Elas foram classificadas em α -, β , e γ -toxinas (Tytgat *et al.*, 1999; Corona *et al.*, 2002). A família α -KTx se divide em 12 subfamílias compreendendo um total de 49 membros (Tytgat *et al.*, 1999). Mais recentemente, seis subfamílias novas foram adicionados (Batista *et al.*, 2002; Goudet *et al.*, 2002).

As toxinas escorpionicas que atuam em canais para potássio têm pouca importância toxicológica, mas agem de forma sinérgica quando associadas a outras toxinas, propiciando potente ação tóxica da peçonha (Gwee *et al.*, 2002).

1.4.2.1 K^+ Neurotoxinas da peçonha de *T. serrulatus*

As toxinas já isoladas, sequenciadas e caracterizadas da peçonha de *T. serrulatus* que atuam em canais para K^+ são denominadas: Ts6, Ts7, Ts8, Ts9, Ts15 e Ts16. Suas características estão descritas na Tabela .

Tabela 4: K^+ Neurotoxinas de *T. serrulatus*

Nome	Outros nomes	Sequência	Massa Molec	pI	Ação
Ts6	TsTX-IV; α -Tx12.1; Potassium channel toxin alpha-KTx12.1; Butantoxin; BuTX	WCSTCLDLACGASR ECYDPCFKAFGRAH GKCMNNKCRCYT	4514.2	8.5	Bloqueio de canais para K^+ de alta condutância ativados por Ca^{2+} , do tipo Kv1.3 e canais para K^+ Shaker B. (Coronas <i>et al.</i> , 2003) (Pimenta <i>et al.</i> , 2003) (Tytgat <i>et al.</i> , 1999)
Ts7	TstX-K α ; Tityustoxin Kalpha; Potassium channel toxin alpha-KTx 4.1; TsII-9; TsTx-K-alpha; TSK4;	VFINAKCRGSPECLP KCKEAIGKAAGKC MNGKCKCYP	3947.8	9.24	Bloqueio com alta afinidade de canais Kv1.3 da família Shaker de canais para K^+ dependentes de voltagem. A toxina age por oclusão os poros. (Eccles <i>et al.</i> , 1994) (Rodrigues <i>et al.</i> , 2003)

	Toxin II-9				
Ts8	Tityustoxin K-beta; TSK2 TsTX-K beta; TsTx-K β	KLVALIPNDQLRSIL KAVVHKVAKT QFGCPAYEGYCND HCNDIERKDGEC HGFKCKCAKD	9728.5	8.72	Bloqueio seletivo de canais para K ⁺ não-inativantes dependentes de voltagem. (Rogowski <i>et al.</i> , 1994)
Ts9	Ts κ ; Ts Kappa; Neurotoxin Ts-kappa; TsKapa; 1TSK	VVIGQRCYRSPDCY SACKKLVGKAT GKCTNGRCDC	3784.4	9.10	Ligante de canais para K ⁺ ativados por cálcio (SK) de baixa condutância sensível a apamina. (Legros <i>et al.</i> , 1996)
Ts15	α -Ktx21.1	GKFGKCKPNICAKT CQTEKGGMGYCN KTEVCSEW (UniProtKB/Swiss-Prot: P86270.1)	3.956	9.0	Bloqueio preferencial dos subtipos de canais para potássio Kv1.2 e Kv1.3 (Cologna <i>et al.</i> , 2011)
Ts16	Tityustoxin-16	GCMKEYCAGQCRG KVSQDYCLKHCKCI PR (UniProtKB/Swiss-Prot: P86271.1)	3.300	-	Homologia com toxinas que atuam em canais para potássio

Fonte: Cologna *et al.*, 2009. Adaptado por Bárbara Mendes

1.4.3 Outras proteínas e peptídeos da peçonha de *T. serrulatus*

Além das neurotoxinas, outros compostos conhecidos da peçonha de *T. serrulatus* são: a Ts4 ou proteína não tóxica; a Ts10 que funciona como potencializadora de bradicinina; Ts11, Ts12 e Ts13, peptídeos pequenos com funções biológicas ainda não esclarecidas; a Ts14 que são hipotensinas e por fim proteases e hialuronidases que auxiliam no espalhamento da peçonha pelo organismo.

Tabela 5: Outras proteínas e peptídeos de *T. serrulatus*

Nome	Outros nomes	Sequência	Massa Molec	pI	Ação
------	--------------	-----------	-------------	----	------

Ts4	TsTX-VI; Tityustoxin-6; Tityustoxin VI; TsTXVI; Toxin VI; Ts VI	GREGYPADSKGCKI TCFLTAAGYCNTTEC TLKKGSSGYCAWP ACYCYGLPESVKIW TSETNKC	6716.6	8.16	Proteína não tóxica capaz de induzir reação alérgica e liberação de neurotransmissor (GABA e Glu). (Marangoni <i>et al.</i> , 1990) (Sampaio <i>et al.</i> , 1996)
TsNTxP	Non-toxic protein NTxP precursor;	MKRMILFISCLLLIDI VVGREGYPADSK GCKITCFLTAAGYC NTECTLKKGSSGYC AWPACYCYGLPDS VKIWTSETNKCCKK	917.8	8.75	Proteína não tóxica, altamente imunogênica. (Chávez-Olórtegui, <i>et al.</i> , 1997)
Ts10	Peptide T	KKDGYPVEYDRAY	1603.7	6.12	Potencializador de bradicinina. (Ferreira <i>et al.</i> , 1993)
Ts11	TsPep1; Peptide TsPep1	KPKCGLCRYRCCSG GCSSGKCVNGACD CS	2946.4	8.74	Função biológica não conhecida. (Pimenta <i>et al.</i> , 2003)
Ts12	TsPep2; Peptide TsPep2 precursor	MKFSCGFLILFLVLS AMIATFSEVEATVK CGGCNRKCCAGGC RSGKICINGKCQCYG RSDLNEEFENYQ	7434.6	8.09	Função biológica não conhecida. (Pimenta <i>et al.</i> , 2003)
Ts13	TsPep3; Peptide TsPep3	TVKCGGCNRKCCP GGCRSGKICINGKCQ CY	3027.6	9.10	Função biológica não conhecida. (Pimenta <i>et al.</i> , 2003)
Ts14	Hypotensin-1 (TsHpt-I)	AEIDFSGIPEDIIKQI KETNAKPPA	2725	4.51	Hipotensina (Verano-Braga <i>et al.</i> , 2008)
	Hypotensin-2 (TsHpt-II)	AEIDFSGIPEDIIKEIK ETNAKPPA	2726	4.36	Hipotensina (Verano-Braga <i>et al.</i> , 2008)
	Hypotensin-3 (TsHpt-III)	AEIDFSGIPEDIIKQI KETNAKPP	2654	4.51	Hipotensina (Verano-Braga <i>et al.</i> , 2008)
	Hypotensin-4 (TsHpt-IV)	AEIDFSGIPEDIIKEIK ETNAKPP	2655	4.36	Hipotensina (Verano-Braga <i>et al.</i> , 2008)

Fonte: Cologna *et al.*, 2009. Adaptado por Bárbara Mendes

Proteases

Enzimas proteolíticas são encontradas em muitos venenos e/ou peçonhas, mas poucos são os estudos que demonstraram a presença de proteases em escorpiões (Almeida *et al.*, 2002).

Almeida *et al.*, (2002) relataram a presença de enzimas proteolíticas com atividade gelatinolítica nas peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*. Essas enzimas apresentaram maior atividade em pH 8,0, o pH ótimo para serino proteases (Walsh; Wilcox, 1970) e apenas o PMSF (inibidor de serino proteases) foi capaz de inibir significativamente sua ação, infere-se então que essas enzimas seriam serino proteases.

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

As enzimas proteolíticas da peçonha de *T. serrulatus* podem aumentar a permeabilidade do tecido, facilitando a propagação das outras proteínas do veneno, e elas podem estar envolvidas no processamento pós-traducional de toxinas. De acordo, com Martin-Eauclaire *et al.* (1994) alguns precursores de toxinas da peçonha de *T. serrulatus* podem sofrer modificações pós-traducionais por proteases tipo exopeptidases e eles sugeriram que as proteases podem, alternativamente, estar envolvidas no processamento pós-traducional de toxinas como Ts1 e Ts3.

Bertazzi (2007) mostrou que a peçonha de *T. serrulatus* contém proteases (MQ-5 e MQ-7), que são capazes de ativar o sistema complemento e podem, portanto, ser importantes no contexto do processo inflamatório que ocorre em consequência do envenenamento.

Hialuronidase

Hialuronidases compreendem um grupo de enzimas que catalisam a degradação do ácido hialurônico, um polissacarídeo encontrado principalmente na matriz extracelular de tecidos conjuntivos (Kreil, 1995). Hialuronidases da peçonha não são tóxicos por si só, mas são considerados como fatores de propagação porque facilitam a difusão das toxinas para os tecidos, contribuindo assim para envenenamentos locais e sistêmicos, uma

vez que aumentam a absorção do veneno e a taxa de difusão através dos tecidos da vítima (Pessani *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1982; Tu; Hendon, 1983; Pukrittayakamee *et al.*, 1988).

A eficácia do tratamento por antipeçonhas escorpiônicas, quando a sua administração não ocorre logo após o acidente, tem sido argumentado por vários autores (Gueron; Ovsyshcher, 1987; Revelo *et al.*, 1996). A rápida difusão do veneno através dos tecidos, que é largamente favorecida pela hialuronidases, restringe a eficácia de antipeçonhas. Pessani *et al.* (1997) demonstraram, pela primeira vez que a peçonha de *T. serrulatus* mostra atividade hialuronidásica.

Pessini *et al.* (2001) isolaram a hialuronidase da peçonha de *T. serrulatus* por cromatografia de troca iônica em CM-celulose a pH 7,8 seguido por uma recromatografia da fração ativa na mesma coluna, a pH 4,7. Eles mostraram que esta proteína afetou a atividade da principal toxina da peçonha, a Ts1, no que se refere a alterações nos níveis séricos de creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LD) e aspartato aminotransferase (AST). Estes autores também demonstraram o efeito inibitório de flavonóides isolados de *Baccharis trimera*, *Grazielia mollissima*, *Gochnatia polymorpha* e *Lychnophora martiana* na atividade da hialuronidase, onde desmethoxicentaureidine (*Gochnatia polymorpha*) foi capaz de produzir mais de 90% de inibição.

O pH ótimo e a temperatura para atividade máxima da hialuronidase isolada (51 kDa) da peçonha de *T. serrulatus* são de 6,0 e 40 ° C, respectivamente. A sua K_M foi de 69,7 mg/ml a 37 ° C e sua atividade específica foi 19.900 ± 1.730 unidade reduzida de turbidez (TRU) / mg contra 845 ± 88 TRU / mg para a peçonha bruta (Pessini *et al.*, 2001).

1.5 Isolamento de toxinas da peçonha escorpiônica

Após as primeiras tentativas para isolar os componentes ativos da peçonha de escorpiões a partir de homogenados de telsons (Wilson, 1904; Mohamed, 1942), várias metodologias foram empregadas.

O método geral de purificação de toxinas de escorpiões, proposto por Miranda *et al.* (1970), consiste em: (a) extração da peçonha com água destilada, para eliminar mucoproteínas que poderiam prejudicar os passos seguintes da purificação, (b) filtração em gel de Sephadex G-50, (c) cromatografia de troca iônica (catiônica e aniônica sucessivamente). Desta forma os autores isolaram 11 neurotoxinas da peçonha dos escorpiões *Androctonus australis Hector*, *Buthus occitanus tunetanus* e *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, ativas em mamíferos, insetos ou crustáceos.

Os primeiros trabalhos de purificação de toxinas da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* Lutz e Mello Campos foram realizados por Diniz e Gonçalves (1956, 1960), utilizando eletroforese em papel e gel de amido. Posteriormente, Gomez e Diniz (1966) extraíram veneno bruto com água e isolaram duas frações tóxicas, utilizando filtração em gel de Sephadex G-25, seguida de cromatografia em Carboximetil-celulose (CM-celulose). Uma destas frações apresentou-se homogênea em eletroforese em papel e foi parcialmente caracterizada por Gomez (1967), sendo denominada Tityustoxina (TsTX).

A partir destes estudos iniciais este veneno tem sido extensivamente estudado e muitas de suas toxinas isoladas e caracterizadas (Coutinho-Netto, 1975; Toledo e Neves, 1976; Possani *et al.*, 1977, 1981; Sampaio *et al.*, 1983; Martin-Euclaire *et al.*, 1985; Arantes *et al.*, 1989, 1994).

Toledo e Neves (1976) purificaram duas toxinas da peçonha de *Tityus serrulatus*, TsTX-I e TsTX-II, através de filtração em Sephadex G-25 e cromatografia em CM-Celulose-52, utilizando gradiente convexo de concentração de acetato de amônio para a eluição. A TsTX-I apresentou N-terminal lisina e peso molecular 6.932, enquanto que a TsTX-II revelou N-Terminal glicina e peso molecular de 8.500. Ambas apresentaram metionina em sua composição.

Possani *et al.* (1977), utilizando filtração em gel de Sephadex seguida de cromatografia em CM-celulose com tampão fosfato e recromatografia em CM-celulose com gradiente de NaCl em tampão acetato, obtiveram a TsTX- γ , que apresentou composição em aminoácidos semelhante à TsTX-I obtida por Toledo e Neves (1976).

Sampaio *et al.* (1983) isolaram e caracterizaram cinco toxinas da peçonha de *Tityus serrulatus*: T1VIII, T1VI, T2III, T2IV e T1IV, sendo que as T1VIII e T2IV apresentaram composição em aminoácidos semelhante à TsTX-I (TOLEDO; NEVES,

1976) ou TsTX- γ (POSSANI *et al.*, 1977). Para a purificação destas toxinas os autores utilizaram filtração em Sephadex e cromatografia em CM-celulose-52 em tampão bicarbonato de amônio, pH 8,0.

Em 1997, Sampaio *et al.* isolaram a TsTX-VII, que libera ácido glutâmico e ácido ácido gama-amino-butírico (GABA) de sinaptosomas de cérebro de rato, efeito não bloqueado pela tetrodotoxina, indicando que seu mecanismo de liberação não envolve canais de Na⁺.

Arantes *et al.* (1989) desenvolveram um processo simplificado para o fracionamento da peçonha de *Tityus serrulatus* na qual foi abolida a filtração em gel de Sephadex. A fração solúvel da peçonha foi cromatografada em coluna de CM-celulose-52, sendo obtidas 13 frações protéicas (I-XIII), das quais a XIII foi considerada pura (Figura 14). A caracterização química desta fração mostrou que a mesma é corresponde à toxina γ (POSSANI *et al.*, 1977). Dessa forma a TsTX-I, considerada a toxina mais abundante e letal da peçonha de *T. serrulatus*, foi obtida em um único passo cromatográfico. A partir da recromatografia das frações obtidas nesse cromatograma, foi identificada a grande maioria das toxinas já estudadas da peçonha. Adicionalmente, foram purificados e caracterizados novos componentes da mesma.

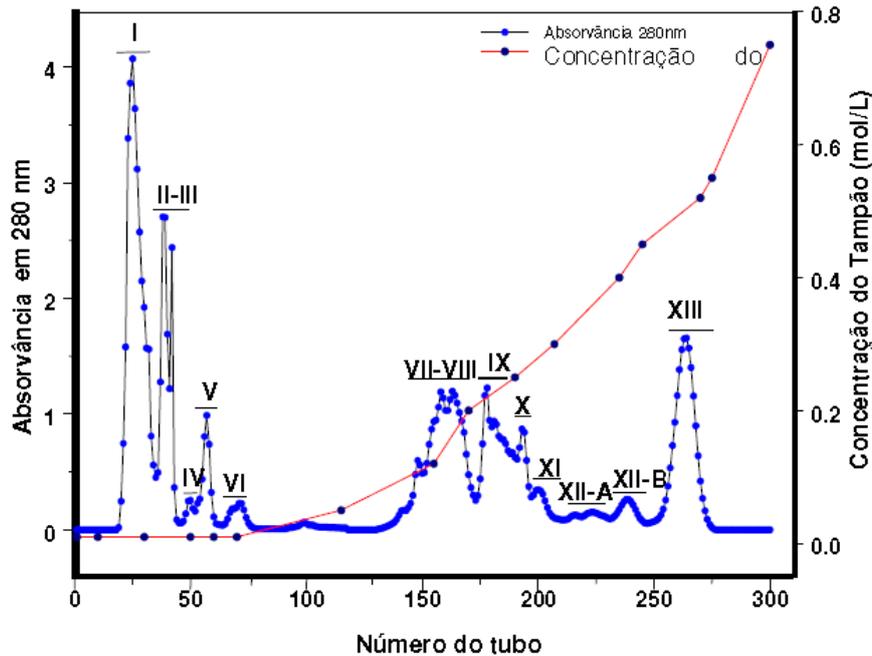


Figura 14: Perfil cromatográfico da fração solúvel da peçonha de *T. serrulatus* fracionada e CM-celulose-52. Coluna de 2,4 x 63,0 cm, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 7,7. Fluxo: 26,7 mL/h; Temperatura 4°C. A amostra foi inicialmente eluída com 150 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,01mol/L, pH 7,8, iniciando-se a seguir um gradiente convexo de concentração do mesmo tampão de 0,01 a 1,0M. Fonte: Bertazzi, 2007.

Da recromatografia da fração IX em CM-celulose-52 utilizando tampão acetato de amônio, pH 4,7 (Arantes *et al.*, 1989) foram obtidas as toxinas IX3 (TsTX-II), semelhante a toxina T1V1 (Sampaio *et al.*, 1983), e a IX5 (TsTX-III), semelhante a toxina III-8 (Possani *et al.*, 1981). Também se encontra na fração IX a hialuronidase da peçonha.

A recromatografia da fração X, nas mesmas condições, revelou duas toxinas purificadas, a X2 e X4. A caracterização química dessas toxinas mostrou que X4 é homóloga à TsTX (Coutinho-Neto, 1975) e a toxina X2 não se identificou com nenhuma outra toxina já isolada de *T. serrulatus*, sendo denominada TsTX-IV, sendo caracterizada como uma α -neurotoxina de peso molecular de 7230,0, capaz de retardar a inativação de canais para Na⁺ sensíveis a voltagem (Arantes *et al.* 1994).

Arantes *et al.*, (1994), a partir da recromatografia da fração XI, obtiveram duas toxinas com elevado teor de pureza, a XI-1 e a XI-2. A toxina XI-1 representa aproximadamente 20% da fração XI e foi identificada como sendo a TsTX. A toxina XI-2 (47% da fração XI) causou o prolongamento do potencial de ação de fibras mielinizadas

do nervo vago de coelho e apresentou uma sequência amino-terminal diferente de qualquer outra já isolada, sendo então denominada TsTX-V.

Em 1996, Chavez-Olórtegui *et al.* purificaram e sequenciaram um peptídeo quase idêntico à TsTX-IV (Marangoni *et al.*, 1990) e denominaram-no de “proteína não tóxica” (TsNTxP), a qual possui uma glicina adicional na região C-terminal e na posição 50, um ácido aspártico no lugar do ácido glutâmico encontrado na TsTX-VI. A TsNTxP foi purificada por uma combinação de filtração em gel e cromatografia de troca aniônica.

Posteriormente, Sampaio *et al.*, (1997) , com uma associação de filtrações e cromatografias de troca catiônica, isolaram a TsTX-VII, que libera ácido glutâmico e ácido gama- aminobutírico (GABA) de sinaptosomas de cérebro de rato, efeito não bloqueado pela tetrodotoxina , indicando que seu mecanismo de liberação não envolve canais para Na⁺. Pessini *et al.* (2001) isolaram a hialuronidade presente na peçonha de *T. serrulatus* utilizando cromatografia em CM-celulose-52 em pH 7,8, seguida de recromatografia na mesma coluna em pH 4,5.

Trabalhos mais recentes tem utilizado a cromatografia líquida de alta performance em coluna de fase reversa C18 (RP-HPLC) como passo final do processo de purificação. Este procedimento mostra-se muito adequado para o fracionamento de toxinas escorpiônicas, visto serem proteínas de baixo peso molecular.

Cologna *et al.*, 2011 purificaram e caracterizaram, por meio de cromatografia de troca iônica em CM-celulose-52 seguida de fase reversa em C18, uma nova neurotoxina de *T. serrulatus* presente na fração X do fracionamento da peçonha em CM-celulose-52, denominada Ts15, com ação sobre canais para K⁺. A Ts15 é o primeiro membro de uma nova subfamília α -KTX da peçonha do escorpião *T. serrulatus*.

A RP-HPLC apresenta alta resolução dos componentes das frações da peçonha como mostra a figura 15.

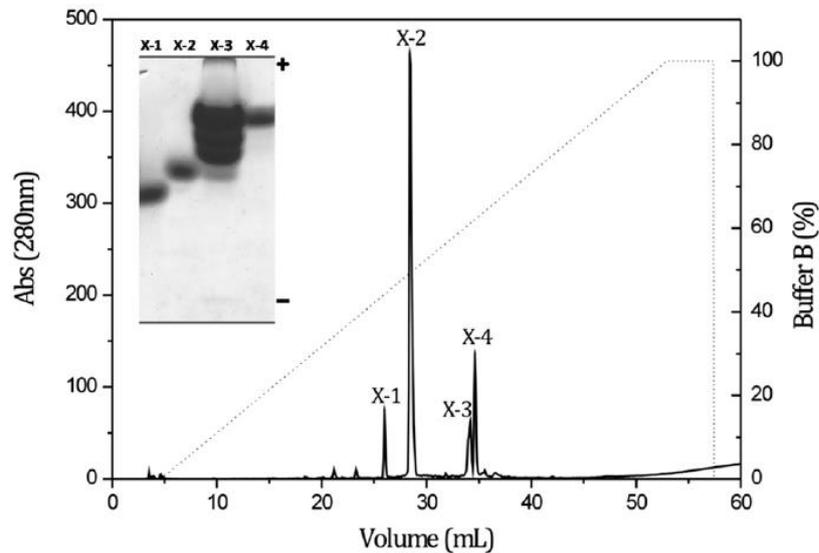


Figura 15: Perfil cromatográfico de RP-HPLC, em coluna C18, da fração X resultante do fracionamento da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-celulose-52. Proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente linear de acetonitrila (0-60%) em 0,1% de ácido trifluoroacético, fluxo de 1 mL/min. Absorbância monitorada a 280 nm. Inseto: PAGE (nativa) de acrilamida a 10% (w / v), pH 4,5. A migração de proteínas é para o cátodo. Fonte: Colonna *et al.*, 2011

1.6 Aplicações Biotecnológicas de toxinas escorpiônicas

O estudo da peçonha escorpiônica é justificável devido às suas inúmeras aplicações, estendendo-se desde a busca de uma terapia mais efetiva para o envenenamento, até o esclarecimento de mecanismos fisiológicos de vários sistemas biológicos, passando por sua potencial utilização como inseticidas e medicamentos.

1.6.1 Desenvolvimento de Terapias para o envenenamento

Para a produção de soro, a peçonha é extraída de escorpiões, recebe substâncias adjuvantes que aumentam seu potencial antigênico e é inoculada subcutaneamente em doses de concentrações crescentes em cavalos. Então é extraído o sangue rico em anticorpos, que são posteriormente purificados. Atualmente a administração de anti-peçonha produzida em cavalos é reconhecida e utilizada como tratamento para acidentes causados por escorpiões. Porém, o seu uso possui algumas desvantagens: o rebanho equino é oneroso, a toxicidade da peçonha diminui o tempo de vida do animal, os anticorpos são heterólogos e podem causar reações de hipersensibilidade, como doença do soro e anafilaxia; além de ser produzido para toda a peçonha incluindo proteínas não tóxicas.

Dessa forma surge a necessidade do desenvolvimento de terapias mais efetivas contra o envenenamento, como a produção de um soro contra as toxinas escorpiônicas mais tóxicas para mamíferos. Isso se torna uma maneira mais efetiva e direcionada no combate dos componentes tóxicos do veneno, uma vez que os anticorpos produzidos serão específicos às toxinas, levando à administração de uma quantidade menor de soro as vítimas.

Uma das terapias que tem sido desenvolvida é a produção de anticorpos humanos pela tecnologia de *Phage Display*, é uma alternativa que começa a ser estudada, por ela não utilizar o rebanho equino, eliminar as reações de hipersensibilidade e os anticorpos serem produzidos diretamente contra toxinas alvo (Pucca, 2009)

A estratégia de produção de anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos recombinantes contra peçonhas ou toxinas vem sendo empregada com sucesso por vários grupos. Alvarenga *et al.* (2003) produziram um painel de 9 Mabs contra a fração tóxica do venenos do escorpião *T. serrulatus*, sendo que o mAb denominado Ts1 foi capaz de neutralizar 50% da atividade tóxica da peçonha bruta. A produção de anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpos recombinantes apresentam uma série de vantagens em relação aos anticorpos inteiros, para utilização tanto no diagnóstico quanto no tratamento de envenenamentos. A possibilidade oferecida pela engenharia molecular

de anticorpos em produzir fragmentos de anticorpos de tamanhos e afinidades diferentes, mono e bi específicos, com novas propriedades farmacocinéticas, abre espaço para um segunda geração de antipeçonhas melhores e mais bem adaptadas ao tratamento das pessoas.

Outra alternativa muito atrativa para solucionar alguns problemas na atual preparação dos soros é o uso de toxinas recombinantes na produção de soro neutralizante. Nosso grupo propõe o uso de toxinas recombinantes para o desenvolvimento de antipeçonhas mais específicas. Procuramos, então, isolar, caracterizar, clonar e expressar toxinas que possam auxiliar na produção de antipeçonhas com alta capacidade neutralizante. Descrevemos, por exemplo, as propriedades imunológicas e químicas das proteínas TsNTxP e LiD1, purificadas da peçonha de *T. serrulatus* e da aranha *Loxosceles intermedia*, respectivamente. Melhora significativa foi obtida com a utilização dessas proteínas recombinantes para produção de antipeçonhas para escorpiões *Tityus* e aranhas *Loxosceles*.

Nossa estratégia de trabalho é baseada na procura de toxinas produzidas na glândula de veneno por meio da análise de bibliotecas de cDNA (Kalapothakis *et al.*, 2007, 2003, 2002, 1998, Felicori *et al.*, 2006, Araujo *et al.*, 2003, Cardoso *et al.*, 2003, Carneiro *et al.*, 2003, Penaforte *et al.*, 2000).

Guatimosim *et al.* (2000) clonou o cDNA da proteína não tóxica de *T. serrulatus* Ts4 (TsNTxP) e expressou em sistema bacteriano usando o vetor pMAL c2 (expressão citoplasmática). O soro anti-proteína recombinante (TsNTxP/MBP) foi capaz de neutralizar eficientemente 20 DL₅₀ da peçonha do escorpião *T. serrulatus*, da mesma maneira que a proteína nativa. Mendes *et al.* (2008) expressaram a Ts1 no vetor bacteriano pET 11a, obtendo uma proteína em corpos de inclusão, que após solubilização foi utilizada para se obter um soro com poder de proteger 75% quando utilizado 2 DL₅₀ da peçonha de *Tityus serrulatus*. Carmo (2011) expressou a Ts3 em vetor bacteriano pET 26, obtendo também uma proteína em corpos de inclusão, cujo soro produzido não foi capaz de proteger eficientemente nenhuma DL 50 da peçonha de *T. serrulatus*, provavelmente essa ineficiência na produção de soro neutralizante se deu pela incorreta conformação obtida por essa toxina recombinante, uma vez que ela reconheceu epitopos lineares mas não epitopos conformacionais da toxina Ts3 nativa .

Entretanto, nem sempre usar uma única tóxina para produção do soro é eficaz para neutralizar todos os efeitos tóxicos da peçonha bruta (Mendes *et al.*, 2008) ou obter um poder neutralizante adequado para utilização em humanos (neutralizar 5DL₅₀ da peçonha) (Guatimosim *et al.*, 2000, Alvarenga *et al.* 2005, Mendes *et al.*, 2004), portanto, estamos trabalhando na produção de uma proteína quimérica em tandem contendo sequências das principais toxinas, responsáveis pelo envenenamento.

1.6.2 Ferramentas Farmacológicas em sistemas biológicos

Toxinas escorpiônicas têm sido amplamente utilizadas como ferramentas farmacológicas para esclarecer sistemas biológicos complexos.

As neurotoxinas que interagem seletivamente com canais para Na⁺, K⁺ ou Ca²⁺ sensíveis à voltagem são ferramentas essenciais para o entendimento da base molecular da excitabilidade elétrica. Elas têm sido utilizadas para estudar as propriedades estruturais e mecanismos de ação dos canais iônicos, examinar as várias condutâncias presentes em diversos tipos de células (Hille, 1992) e identificar diferentes tipos de canais e o papel fisiológico dos mesmos. Também devido à sua alta afinidade, as toxinas podem ser usadas como ferramentas no isolamento de canais e no estudo de sua distribuição (Lombet; Lazdunski, 1984; Lazdunski *et al.*, 1986; Boudier *et al.*, 1988)

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar algumas patologias, como por exemplo, epilepsia, hipertensão, arritmias cardíacas e doenças auto imunes como esclerose múltipla, artrite reumatoide, psoríase e diabetes do tipo I. Apesar das bases bioquímicas destes processos não estarem bem compreendidas, sabe-se que os canais iônicos (principalmente canais para K⁺) exercem papel fundamental nas suas manifestações, tornando-se dessa forma alvos importantes para a pesquisa de moduladores seletivos de alta afinidade a tipos específicos de canal e desenvolvimento de novos fármacos. Os efeitos fisiológicos produzidos pelas toxinas de escorpiões, bem como sua especificidade pelos canais iônicos, fazem dessas moléculas importantes modelos aplicáveis nestas áreas (Giangiacomo *et al.*, 2007; Rajendra *et al.*, 2004).

Portanto, pesquisas utilizando toxinas de escorpiões são promissoras, principalmente considerando-se a biodiversidade de compostos que ainda podem ser descobertos e explorados.

1.6.3 Potenciais medicamentos

Toxinas com ação em canais para K^+ mostram baixa toxicidade, o que torna possível sua utilização como potenciais medicamentos. O bloqueio de canais para K^+ induz muitas condições fisiopatológicas, contudo há exemplos em que o bloqueio de um determinado canal para potássio pode produzir um efeito terapêutico desejado. Por exemplo, a terapia de primeira linha para o tratamento de diabetes tipo II são sulfoniluréias, compostos que bloqueiam canais para K^+ dependentes de ATP em células β pancreáticas. Além disso, dofetilida, um inibidor de canais I_{kr} , é usado para a conversão e a manutenção de ritmo sinusal em pacientes com fibrilação arterial. Potenciadores cognitivos, como linopiridina e XE-991, são bloqueadores de canais KCNQm (Lewis; Garcia, 2003)

Entre os canais K_v , o subtipo $K_v1.3$ tem sido bastante estudado como promissor alvo farmacológico em doenças autoimunes, pois desempenha papel crucial na patogênese dessas doenças, portanto inibidores seletivos para $K_v1.3$ podem representar uma terapia adequada para o tratamento da esclerose múltipla e outras doenças autoimunes como diabetes tipo I, psoríase e artrite reumatóide. Bloqueadores de canais $K_v1.3$ inibem a reação de hipersensibilidade retardada à tuberculina, indicando que esses canais poderiam ser alvo de agentes imunossupressores (Beeton *et al.*, 2001; 2003; 2005; 2006).

Bloqueadores seletivos para canais de K^+ podem também ser efetivos no tratamento de câncer, visto que o gene humano relacionado aos canais para K^+ do tipo hERG (*ether-a-go-go-related-gene*) parece ser expresso em grandes proporções em diferentes tumores. Neste contexto, a seletividade das ErgTx toxinas, BeKM-1 e APETx-1 para canais do tipo hERG pode ter implicações terapêuticas (Korolkova *et al.*, 2002; Diochot *et al.*, 2003).

Toxinas que bloqueiam canais para Cl^- apresentam alto potencial para o tratamento de câncer, pois a expressão dos mesmos em diferentes tipos de câncer é muito

maior que a normal. A clorotoxina, um peptídeo composto por 36 aminoácidos, isolado de uma espécie de escorpião israelense *Leiurus quinquestriatus* (Debin *et al.*, 1993), pode bloquear canais para Cl⁻ de epitélio de rato e também ligar-se especificamente a canais para Cl⁻ com alterações patológicas em células gliais apresentando, portanto, potencial para o tratamento de câncer e aplicação para o estudo de células tumorais (Ullrich *et al.*, 1995; Zhijian *et al.*, 2006).

Com base nessas constatações a TransMolecular Inc. está executando ensaios com a ¹³¹I-TM-601 (¹³¹I-clorotoxina) visando seu uso como uma nova droga para o tratamento de gliomas. Estudos realizados em pacientes com glioma recorrente, que receberam na cavidade tumoral injeção de clorotoxina marcada com iodo radioativo (¹³¹I-TM-601), demonstraram que ela apresenta alta afinidade com a parede de glioma, quando comparada ao tecido normal. Estes dados sugerem que uma grande dose de radiação pode ser liberada no local para matar células tumorais residuais, sem toxicidade ao tecido normal. Esta nova molécula apresenta um potencial promissor na melhoria de pacientes com glioma (Mamelak *et al.*, 2006).

Os dados apresentados acima mostram a relevância dos estudos com peçonhas de escorpiões, por serem fontes inestimáveis de compostos que apresentam alta especificidade para alvos importantes em diferentes sistemas biológicos, destacando o potencial das toxinas para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.6.4 Potenciais inseticidas

Uma característica importante de toxinas de escorpião é a sua habilidade em discriminar canais de invertebrados e canais de vertebrados. Toxinas escorpiônicas inseto-seletivas poderiam servir para o desenvolvimento de inseticidas modernos a serem usados no combate a pragas em lavouras, trazendo importantes benefícios a agricultura (Bosmans; Tytgat, 2007)

Os inseticidas clássicos (DDT, Organofosforados e Carbamatos), introduzidos entre as décadas de 1940 e 1960, são altamente tóxicos para seres humanos e seu mecanismo de ação envolve interações com receptores de acetilcolina do sistema nervoso

central, canais para sódio dependentes de voltagem, receptores de GABA, receptores para Glutamato e acetilcolinesterase (Nicholson, 2007).

O uso intensivo deste inseticida conduziu ao desenvolvimento de resistência em muitas espécies de insetos e projetos foram desenvolvidos para substituir estas substâncias químicas. Por exemplo, devido a falta de toxicidade da toxina AaHIT (do escorpião *Androctonus australis Hector*) em mamíferos e sua atividade altamente potente em insetos, a mesma foi usada para reforçar a ação inseticida natural do baculovirus (Zlotkin *et al.*, 2000). A inserção do gene que codifica a AaHIT causa um aumento da mortalidade de insetos causada pelo baculovirus (principalmente contra lepdópteros). Mais recentemente as pesquisas neste campo têm focado no aumento da eficácia do baculovirus com toxinas de escorpião que interagem cooperativamente (Regev *et al.*, 2003). Porém, mais pesquisas são necessárias para que a baculovirose de recombinantes possa ser considerada como uma alternativa ou adjuvante para os inseticidas químicos que são usados hoje em dia.

1.7 Toxinas recombinantes

A expressão de toxinas de animais peçonhentos já é realidade a algum tempo (Carbonnel *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 1991; Pang *et al.*, 1992; Martin-Eauclaire *et al.*, 1994; Chejanovsk *et al.*, 1995). Ela surgiu da necessidade de se obter toxinas animais em grande quantidade, uma vez que a quantidade de toxina obtida diretamente da peçonha ou veneno pode ser bastante limitada. Dentre as várias estratégias utilizadas, podem-se incluir sistemas que permitem a expressão das seqüências clonadas em bactérias, leveduras, células de insetos e plantas.

Bactérias e leveduras são sistemas mais bem estabelecidos para super expressão de genes exógenos. Cada sistema tem vantagens e desvantagens. A expressão em leveduras conta com toda a maquinaria de um organismo eucarioto, produzindo assim uma proteína recombinante possivelmente com atividade biológica (Martin-Eauclaire *et*

al., 1994; Gabrielsen *et al.*, 1990; Thim *et al.*, 1986). As desvantagens deste sistema são: dificuldade na expressão, toxicidade da proteína expressa para a levedura (Martin-Eauclaire *et al.*, 1994) e falha no processamento da proteína (Pang *et al.*, 1992). O sistema de expressão bacteriano se destaca pela fácil manipulação e o rápido crescimento das bactérias que facilita muito a obtenção de grandes quantidades de proteínas.

As desvantagens deste sistema estão na dificuldade de obtenção da conformação da proteína próxima a da nativa (Pang *et al.*, 1992), degradação desta pelas proteases bacterianas (Makides, 1996; Pang *et al.*, 1992), produção da proteína na forma insolúvel em corpos de inclusão (Marston, 1986) e as diferenças nos códons preferenciais bacterianos e da toxina que pode interferir no processo de alongamento durante síntese protéica; muitas vezes não sendo possível a produção de proteínas biologicamente ativas (Makides, 1996). Entretanto, nosso grupo tem obtido resultados positivos utilizando corpos de inclusão no processo de imunização (Lobato *et al.*, 2010).

Martin-Eauclaire *et al.* (1994) obtiveram êxito parcial na expressão de uma toxina de escorpião, a AaHIT1 (inseto-toxina isolada do veneno do escorpião *Androctonus australis Hector*). Esta inseto-toxina foi expressa em células de leveduras após a subclonagem do cDNA correspondente no plasmídeo pMAa1. A proteína expressa apresentou atividade biológica, entretanto pequenas quantidades da proteína (4 µg/L de cultura) foram obtidas empregando-se esta estratégia. Pang *et al.* (1992) expressou uma inseto-toxina I5A isolada do veneno do escorpião *Buthus eupeus* em leveduras, conseguindo um alto nível de expressão (50-100 µg/L de cultura), mas a toxina recombinante não apresentou toxicidade que pode estar relacionado a um processamento indevido na extremidade N-Terminal.

Os níveis de expressão mais altos obtidos com toxinas de escorpião, biologicamente ativas, foram encontrados em vetores para bactérias: 1mg/L de cultura de BotXIV (Bouhaouala-Zahar *et al.*, 1996), 300 µg/L de cultura de kalitoxina 2 (Legros *et al.*, 1997), 1mg/L de cultura de caribdotoxina (Park *et al.*, 1991).

No entanto, algumas vezes ocorrem exceções e o produto expresso não consegue assumir uma conformação adequada e são necessárias etapas de desnaturação e renaturação da proteína (Rudolph *et al.*, 1998). Ou ainda pode ocorrer da proteína formar

agregados insolúveis, os corpos de inclusão, que devem ser isolados e solubilizados (Rudolph & Lilie, 1996).

Em adição, muitos progressos têm sido feitos na área de expressão de genes eucariotos em bactérias. Vários vetores foram construídos na tentativa de melhorar a estabilidade e conformação das proteínas expressas. Estratégias para minimizar a proteólise de proteínas recombinantes em *E. coli* e melhorar a conformação das proteínas têm sido revisadas em detalhes: proteína alvo exportada para periplasma ou meio de cultura, uso de linhagens deficientes de proteases, proteínas de fusão, gene alvo em tandem, co-expressão com chaperonas, crescimento usando tempos menores, uso de códons preferenciais para bactérias, entre outros (Makides, 1996).

Bouhaouala-Zahar *et al.* (1996) conseguiram expressar a inseto toxina Bot XIV (inseto toxina do escorpião *Buthus occitanus tunetanus*) produzida em fusão com dois domínios Z da proteína A, em células bacterianas. Os altos níveis, alcançados na expressão desta proteína, permitiram a purificação de grande quantidade do produto recombinante, que foi utilizado como imunógeno para camundongos. O soro obtido apresentou características neutralizantes, sugerindo que a estrutura adotada pela toxina na proteína híbrida foi próxima à apresentada pela nativa.

Matavel *et al.* (2002) clonou o cDNA do peptídeo neurotóxico Tx2-6 da *Phoneutria nigriventer* e expressou em sistema bacteriano usando o vetor pMAL c2. A proteína de fusão Tx2-6/MBP foi capaz de induzir efeitos excitatórios no canal de sódio, porém com menor intensidade e sem letalidade quando inoculada intracerebroventricular em camundongos. Estudos eletrofisiológicos mostraram que a proteína clivada Tx2-6-rec, MBP e proteína de fusão Tx2-6/MBP não alteraram os parâmetros cinéticos das correntes de sódio em músculo liso de rã, entretanto a Tx2-6/MBP foi capaz de aumentar o pico da corrente de sódio aproximadamente em 50%.

Nosso grupo se destaca pela utilização de técnicas de clonagem e expressão de toxinas (Penaforte *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2003; Kalapothakis *et al.*, 2007, 2003, 2002, 1998; Araujo *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2003; Felicori *et al.*, 2006).

Kalapothakis *et al.* (2002) clonou e expressou a LiD1, uma proteína também expressa na glândula de veneno da aranha-marrom *Loxosceles intermedia* com atividade dermonecrótica que tem sido encontrada em aranhas do gênero *Loxosceles*. LiD1 foi

clonado utilizando a mesma biblioteca de cDNA construída a partir da glândula de veneno de *L. intermedia* e anticorpos contra proteínas com atividade dermonecrótica isoladas a partir da peçonha bruta da presente aranha. LiD1 foi expressa como uma proteína fundida com a proteína beta-galactosidase utilizando o vector pBK-CMV, resultando na recLiD1 proteína recombinante com importantes propriedades imunológicas. A recLiD1 foi fortemente reconhecida por anticorpos anti-dermonecrótica e também foi capaz de gerar anticorpos reativos contra as proteínas nativas dermonecróticas isoladas a partir da peçonha de *L. intermedia*. Dias-Lopes *et al.* (2010) mostrou que injeções em ratos da peçonha bruta de *Loxosceles intermedia* da toxina recombinante recLiD1, produzem sintomas sistêmicos semelhantes aos encontrados em seres humanos envenenados. Este modelo animal foi utilizado para caracterizar os efeitos da peçonha de *Loxosceles intermedia* em tecidos cardíacos, mostrando que ela desempenha um papel chave na disfunção do coração

Araujo *et al.* (2003) clonou uma proteína homóloga à toxina dermonecrótica a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, a toxina foi expressa em células de *E. coli* como uma proteína de fusão com beta-galactosidase (Li-rec) e foi purificada por filtração molecular e cromatografia de afinidade (Kalapothakis *et al.*, 2002). A proteína Li-rec foi caracterizada e utilizada como um antígeno para produção de anticorpos em coelhos e camundongos. Os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer a peçonha bruta. Ensaios de neutralização *in vitro* indicaram que 1 ml de soro de coelho contra Li-rec foi capaz de neutralizar 25 DL₅₀ da peçonha bruta. Em experiências de protecção *in vivo*, camundongos imunizados foram desafiados com várias doses da peçonha de *Loxosceles*, e foram totalmente protegidos contra 2,5 DL₅₀ da peçonha.

Guatimosim *et al.* (2000) clonou o cDNA da proteína não tóxica do *T. serrulatus* TsNTxP e expressou em sistema bacteriano usando o vetor pMAL c2 (expressão citoplasmática), as características imunogênicas da Ts4 recombinante foram as mesmas da Ts4 nativa. Mendes *et al.* (2008) expressaram a Ts1 no vetor bacteriano pET 11a, obtendo uma proteína em corpos de inclusão, que após solubilização foi utilizada para se obter um soro com poder de proteger 75% quando utilizado 2 DL₅₀ da peçonha de *Tityus serrulatus*.

Recentemente, nosso grupo obteve sucesso na clonagem e expressão de uma toxina bacteriana. Souza *et al.* (2010) clonou o gene da toxina épsilon produzida por *Clostridium perfringens* que desencadeia enterotoxemia em ovinos, caprinos e bezerros, podendo levar a morte repentina do animal afetado. A intervenção terapêutica é um desafio, porque a doença progride muito rapidamente, no entanto, pode ser prevenida pela imunização com vacinas específicas imunogênicas. A clonagem do gene *etx*, que codifica a toxina epsilon, ocorreu no vector pET-11a; a toxina epsilon recombinante (rec-epsilon) foi expressa em corpos de inclusão e foi utilizado para a imunização de coelhos. Proteção do soro foi avaliada e testes de neutralização cruzada de soro foram utilizados para caracterizar a toxina recombinante. Para analisar o potencial antigênico da toxina, os coelhos foram imunizados com 50, 100 ou 200 µg de toxina recombinante, utilizando gel de hidróxido de alumínio como adjuvante. Os títulos de 10, 30 e 40 IU / mL foram obtidos, respectivamente. Estes títulos foram superiores ao nível mínimo exigido pela Farmacopeia Europeia (5 UI / mL) e pelo Código de EUA Federal regulamento (2 UI / mL). Assim, a rec-epsilon é um bom candidato para a produção de vacina contra a enterotoxemia causada pela toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D.

Várias proteínas recombinantes foram expressas no espaço periplasmático de bactérias *E. coli*, com alto nível de expressão e com produção de proteínas recombinantes com características das proteínas nativas e com atividade biológica. Swartz & Mackinon (1995) expressaram a hanotoxina (HaTx - toxina da aranha Chilean Tarântula) em fusão com a MBP no periplasma, após clivagem a proteína recombinante purificada foi capaz de inibir 55% da corrente de potássio, intimamente de acordo com a inibição da HaTx nativa. A kaliotoxina (KTX) isolada do veneno do escorpião *Androctonus australis* também foi expressa no periplasma e era completamente ativa após etapas de renaturação (Legros *et al.*, 1997). Smith *et al.* (1993) expressaram no periplasma a dentrotoxina, toxina isolada da mamba preta; a proteína recombinante foi expressa em grandes quantidades e apresentou atividade biológica.

Dessa forma, estudos com toxinas recombinantes tem se mostrado uma ferramenta importante para a ampliação de estudos com toxinas de baixo rendimento, além de apresentar um leque de possíveis aplicações para o desenvolvimento científico e biotecnológico.

1.7.1 Toxina Ts1 recombinante

Nosso grupo vem trabalhando há algum tempo com toxinas recombinantes de *Tityus serrulatus* visando à produção de imunógenos eficientes contra a peçonha desse animal. Em um estudo voltado para a toxina Ts1 recombinante (Mendes, 2007) foram construídos clones com 1 cópia, 2 e 4 cópias em tandem dessa toxina denominados respectivamente Ts1-1, Ts1-2 e Ts1-4.

A sequência nucleotídica correspondente à sequência da toxina Ts1 foi previamente obtida a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* presente em nosso Laboratório (Kalapothakis *et. al.*, 2001).

Mendes (2007) expressou a toxina Ts1 recombinante com uma cópia (Ts1-1) e com duas cópias em tandem (Ts1-2) em células BL21 (DE3) e avaliou o potencial de neutralização do soro obtido por imunização com essas toxinas, contudo a construção com 4 cópias em tandem (Ts1-4) não foi trabalhada e se tornou objeto de estudo do presente trabalho.

A contração da Ts1-4 se encontrava em vetor pGEM-T Easy e o sequenciamento desse clone mostrava a existência de um códon de parada prematuro, localizado antes do início da toxina (Figura 19), Mendes (2007).

Figura 16: Sequenciamento da Ts1-4 em pGEM-T Easy (Mendes, 2007). Em azul o sítio de restrição da >consenso T7-tag; BamHI; HindIII; EcoRI; Ts1; Stop codon, pET11a

```
TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT CGC GGATCC AGCTATGACCATGATTACGCC
AAGCGCGCAATTAACCCCTCAC TAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTA
TCGAT AAGCTT AAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATC
GGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCCGCGTGTTAC
TGCTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGT AAGCTT AAAGAAGGTT
ATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATG
CGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCCGCGTGTTACTGCTACGGGCTTCCAAATTGG
GTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGT AAGCTT GATATC GAATTC ATCGAT AAGCTT AAAGAAG
GTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGA
ATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCCGCGTGTTACTGCTACGGGCTTCCAAAT
TGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGT AAGCTT AAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAG
GTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTC
ATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCCGCGTGTTACTGCTACGGGCTTCCAAATGGGTGAAAGTTTGGGATAGA
GCGACGAACAAATGT AAGCTT GATATC GAATTC CTGACCCGGG GGATCC GGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
GGAAGCTGAGTT
```

>aminoácidos

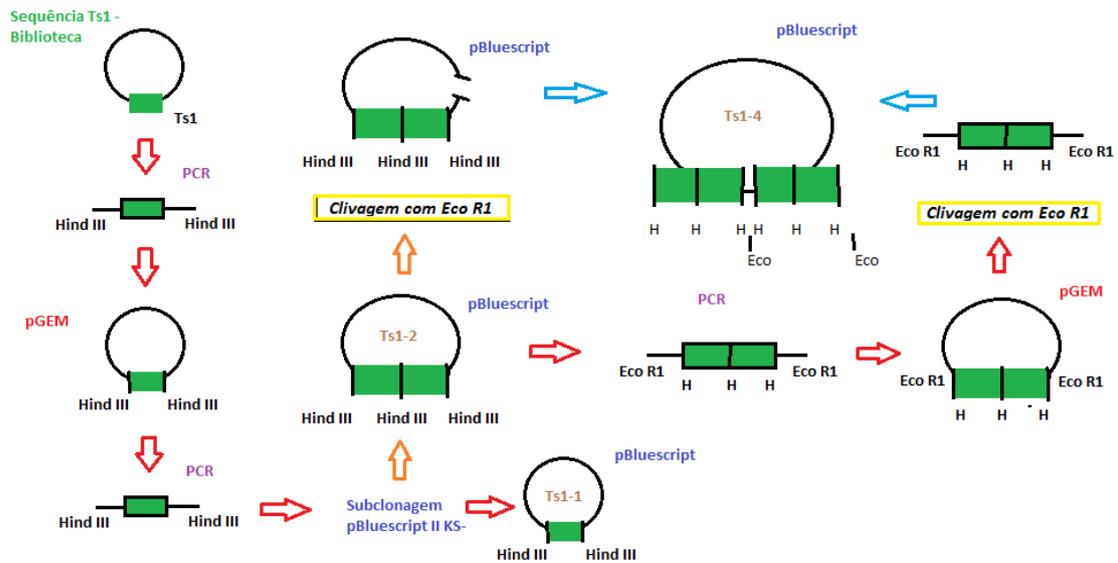
```
MASMTGGQMG RGS SYDHDYAKRAINPH stop REQKLTGPPLEVDGIDKLKEGYLSDHEGCKLSCFIRP
SGYCGRECGIKKSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCKLKEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRE
CGIKKSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCKLDI EEFIDKLKEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGR
ECGIKKSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCKLKEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKK
SSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCKLDI EFLTRGIRLL
```

enzima BamHI, em amarelo o sítio da enzima HindIII, em verde o sítio da enzima EcoRI, em cinza a sequência da toxina Ts1 de *Tityus serrulatus*, em sublinhado a sequência do vetor pGEM-T Easy. Destaque para a sequência em vermelho, um códon de parada precedendo o início da toxina.

A grande quantidade de sítios para enzimas de restrição presentes nessa construção se deve ao fato de como ocorreu sua montagem (Figura 20). Em um primeiro momento foi adicionado por PCR o sítio de restrição da enzima HindIII nas extremidades da sequência da toxina Ts1 para que ela fosse clonada no vetor pGEM-T Easy através deste sítio. Com a sequência inserida no vetor pGEM-T Easy, sucedeu-se outra PCR que amplificaria o fragmento da Ts1 com extremidades HindIII, para posterior subclonagem no vetor pBluescript. No momento da clonagem no pBluescript ocorreu um fato curioso, a clonagem de 2 cópias da toxina Ts1 em tandem, provavelmente durante a PCR foram formados produtos que se ligaram e foram clonados juntos. Então foi adicionado por PCR as extremidades da Ts1 com duas cópias o sítio de restrição para EcoRI e ela foi

novamente clonada em vetor pGEM-T Easy. Por fim a sequência da Ts1 com 2 cópias flanqueada por EcoRI foi retirada do vetor pBluescript e inserida no vetor pET 11a.

Figura 17: Esquema da construção da toxina recombinante Ts1-4. Dados obtidos de Mendes (2007).



Representação: Bárbara Mendes.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de neutralização dos soros obtidos através da imunização de coelhos com a toxina Ts1 nativa do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* e com sua forma recombinante Ts1-4 com quatro cópias em tandem, frente ao veneno bruto e a toxina Ts1 nativa.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter a peçonha bruta de *Tityus serrulatus*
- Purificar a toxina Ts1 da peçonha bruta de *Tityus serrulatus*
- Clonar a sequência da Ts1-4 em vetor pET 11a
- Expressar e purificar a toxina recombinante Ts1-4
- Imunizar coelhos com a toxina recombinante (Ts1-4), Ts1 nativa e peçonha bruta.
- Avaliar o potencial de neutralização dos soros anti-peçonha bruta, anti-Ts1-4 recombinante e anti-Ts1 nativa

Justificativa

3 Justificativa

O nosso grupo está envolvido na pesquisa de novos imunógenos da peçonha de *Tityus serrulatus* e vem buscando entender melhor a produção de anticorpos neutralizantes.

A descoberta da TsNTxP deu um grande impulso em nossas pesquisas. Inicialmente, estudamos os efeitos da proteína nativa, mas sua obtenção possui alguns problemas, tais como: conseguir quantidade suficiente de veneno para sua purificação e as várias purificações necessárias para se obter a proteína pura, uma vez que ela representa menos que 1% do veneno total. Esses fatores em conjunto tornam inviável a utilização da TsNTxP nativa para a produção de um soro de uso comercial. Sendo assim, foi feita uma busca do cDNA da TsNTxP em uma biblioteca de cDNA de *T. serrulatus* construída a partir da glândula do veneno deste escorpião (Guatimosim *et al.*, 1999). Uma vez clonada, essa proteína foi expressa em grandes quantidades em bactérias e o seu poder neutralizante testado (Guatimosim *et al.*, 2000); o soro obtido (100 μ L) era capaz de neutralizar até 3DL₅₀.

Nossos resultados indicam que mais estudos devem ser realizados para se obter um imunógeno mais eficaz. As proteínas utilizadas devem produzir um soro com poder neutralizante suficiente para uso terapêutico e com poder neutralizante superior daqueles obtidos atualmente. Uma ampola de 5 mL do soro produzido pelo Instituto Butantan neutraliza no mínimo 7,5 DMM – doses mínimas mortais – do veneno de *T. serrulatus* (www.vacinas.org.br/vacinas26.htm). Uma ampola com o mesmo volume de soro produzida pela FUNED neutraliza no mínimo 5 mg do veneno de referência do escorpião amarelo (1 mg/mL) (www.funed.mg.gov.br/produtos_servicos/imunobiologicos/bulas/Bula_Soro_Antiescorpionico_ver.04.pdf).

Como a utilização de toxinas nativas é inviável para produção em larga escala de soro anti-escorpiônico, decidiu-se utilizar proteínas recombinantes expressas em sistemas procariotos para obtermos novos imunógenos a serem testados.

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

O sistema procarioto foi o escolhido por ser o mais simples, mais barato e com mais ferramentas disponíveis. O problema de usar este tipo de sistema para expressar proteínas de baixa massa molecular como as toxinas é que estas proteínas são facilmente degradadas no citoplasma das células bacterianas. Para aumentar a estabilidade de pequenas proteínas expressas em bactérias foi desenvolvida uma estratégia que permitia a expressão de vários genes em série (em tandem) da mesma proteína, aumentando assim o produto a ser expresso (Gigova *et al.*, 1989; Ishikawa & Tamaoki, 1996). Portanto, nosso intuito foi a utilização desta estratégia (proteínas em tandem) para produzir proteínas recombinantes mais estáveis no citoplasma de bactérias e com uma capacidade de gerar anticorpos com um grande poder de neutralizar a peçonha de *Tityus serrulatus*.

Um estudo voltado para a toxina Ts1 recombinante (Mendes *et al.*, 2008), como dito anteriormente, descreveu as características imunológicas dessa toxina e avaliou a produção de anticorpos neutralizantes contra do veneno bruto de *T. serrulatus*. Ts1 recombinante com uma cópia (Ts1-1) ou duas cópias em tandem (Ts1-2) foi expressa em células BL21 (DE3). Coelhos e camundongos foram imunizados com as proteínas recombinantes (corpos de inclusão) e testados para a produção de anticorpos neutralizantes. Ensaio de neutralização mostraram que os soros anti-Ts1-1 e anti-Ts1-2 foram capazes de neutralizar a peçonha bruta e a toxina Ts1 nativa de *T. serrulatus*. Assim, Ts1 poderia ser usado em coquetel de imunógenos para produção de anti-veneno de *T. serrulatus*. Entretanto é necessária a avaliação do potencial de neutralização do soro produzido contra a toxina Ts1 nativa, e também do soro produzido contra outras formas

dessa toxina recombinante, que não foram testados no mesmo trabalho, para entendermos a capacidade de produção de anticorpos em todas as formas da toxina. Nesse contexto, trabalharemos com uma forma recombinante de Ts1 com 4 cópias em tandem (Ts1-4) também expressas em células BL21 e com a forma nativa dessa toxina, avaliando o potencial de produção de anticorpos dessas duas formas e comparando com os resultados já obtidos com Ts1-1 e Ts1-2. Esse estudo trará novas perspectivas para a identificação de melhores antígenos da peçonha bruta de *T. serrulatus* para uso no desenvolvimento de uma melhor anti-peçonha.

Metodologia

4 Metodologia

4.1 Animais

Foram utilizados escorpiões da espécie *Tityus serrulatus*, coletados no município de Belo Horizonte-MG e mantidos em cativeiro, para extração da peçonha bruta, com autorização do IBAMA de número 31800-1.

Coelhas da raça Nova Zelândia pesando aproximadamente 2 Kg e com cerca de 4 meses foram utilizadas para ensaios de imunização, e sofreram sangria parcial periodicamente para obtenção de soro.

Camundongos fêmeas da raça Swiss linhagem CF1 pesando 20g foram utilizados para os ensaios de DL50 (Determinação da dose letal para 50% da população), e para ensaios de neutralização.

Os camundongos foram fornecidos pelo CEBIO – UFMG, e os coelhos foram obtidos na Fazenda de Veterinária da UFMG, localizada em Igarapé / MG.

O projeto foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) no Campus Pampulha da UFMG (protocolo número 257/11).

4.2 Obtenção da peçonha de *Tityus serrulatus*

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* foi extraída por estímulo elétrico do telson do animal, diluída 5 vezes com água ultrapura (Phoneutria) e imediatamente centrifugada à 13.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido e estocado à -20°C.

Para dosagem de proteínas totais da peçonha foi utilizado o Kit DC Protein Assay do fabricante Bio Rad.

4.3 Fracionamento da peçonha bruta de *Tityus serrulatus* e Purificação da toxina Ts1

O fracionamento do extrato bruto da peçonha de *T. serrulatus* foi realizada como descrito por Arantes *et al.* (1989). Nesse método foram obtidas quatorze frações designadas I – XIV das quais a fração XIV é considerada pura e igual a Ts1 (Cologna *et al.*, 2009).

Uma coluna de vidro de 2,5 cm x 63,0 cm foi preparada com a resina CM-celulose-52 microgranular pré-umidecida da *Whatman*. A resina foi tratada da seguinte maneira: primeiramente foi suspensa em tampão Bicarbonato de Amônio 0,2M e mantida sob agitação por 3 minutos, no período de agitação o pH da resina foi ajustado para 7,8. Em seguida, a resina foi decantada, ressuspensa e novamente decantada, neste momento o tampão foi parcialmente removido de modo que permanecesse o equivalente a 20% do volume da resina. Essa massa foi então deaerada e vertida rapidamente na coluna.

Após o empacotamento da coluna, a mesma foi levada para a câmara fria (4°C) e equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M pH 7.8 por 18 horas, sob o fluxo de 20 mL/h.

A amostra de 500 mg do extrato bruto da peçonha liofilizada, foi solubilizada em 2 mL de tampão Bicarbonato de Amônio 0,01 M pH 7.8, centrifugada à 13.000 rpm por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi aplicado à coluna e eluído com o mesmo tampão sob o fluxo de 20 mL/h por 24 horas (430 mL). Foram coletadas 86 frações de 5 mL. Então foi iniciado um gradiente convexo de concentração de tampão Bicarbonato de Amônio de 0,01 M a 0,6 M pH 7.8, sob o mesmo fluxo por 45,5 horas (820 mL), foram coletadas 164 frações de 5 mL.

O sistema utilizado para a obtenção do gradiente convexo de concentração consiste de um kitassato de 1000 mL, contendo 500 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,01 M, conectado à coluna e a outro recipiente contendo 500 mL do tampão 1,0 M, de modo que nos dois recipientes a altura do tampão foi a mesma.

As frações coletadas tiveram suas absorbâncias determinadas em 280 nm e o valor de concentração do tampão foi obtido através da medida da condutividade das

frações em tubos espaçados. Os valores de condutividade foram lançados em uma curva padrão, traçados com concentrações molares conhecidas do tampão, obtendo-se assim a concentração molar do sal nos tubos. As frações foram reunidas com base no perfil cromatográfico obtido pela leitura de absorvância à 280 nm. Para completa remoção do sal, as frações foram liofilizadas, ressuspendidas em volume inicial de água ultrapura (Phoneutria) e novamente liofilizadas e posteriormente armazenadas em freezer à -20°C.

4.4 Caracterização da fração XIV – Ts1

4.4.1 Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante SDS- PAGE (Laemmli, 1970) preparado em placas de vidro com dimensão de 10,0 x 8,0 x 0.2 cm, com espaçadores de 1 mm. O gel de separação era constituído de 12% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0.05 % (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4 % (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0.1% (p/v); (PSA) 50 mM e TEMED 0.025% (v/v). O gel de separação foi preparado e colocado entre as placas de vidro, ao se polimerizar o gel de concentração foi colocado sobre o gel de separação e introduzido nele um pente de 10 canaletas. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante 2x concentrado para SDS-PAGE (100 mM de Tris-HCl pH:6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de -mercaptoetanol; 20% de Glicerol), fervidas durante 5 minutos e aplicadas nas canaletas do gel.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese SDS-PAGE (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 120 V, 30 mA, durante aproximadamente 2 horas, até que o tampão da amostra atingisse o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Coomassie Blue (0,25% de Coomassie Blue, 45% de metanol, 9% ácido acético glacial) por 20 minutos (25°C) e

lavados em solução descorante (45% metanol e 9% ácido acético glacial) até o desaparecimento da coloração de fundo.

4.4.2 Determinação da massa molecular

A determinação da massa molecular foi realizada pelo Centro de Espectrometria de Massas Aplicada – CEMSA localizada na Universidade Federal de São Paulo.

O equipamento utilizado foi o Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF – UltrafleXtreme (Bruker). À amostra foi adicionado 10 uL de solução TFA 0,1% e 10uL de matriz α -ciano. A aquisição foi feita pelo modo de análise linear no modo positivo.

4.5 Inserção de adaptadores a sequência da Ts1-4 e padronização da Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a remoção do códon de parada prematuro da Ts1-4 e conseqüente reclonagem no vetor pGEM-T Easy, foi inserido bem próximo às extremidades 5' e 3' da toxina o sítio de reconhecimento da enzima de restrição BamHI, presente no sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor. Este sítio foi adicionado por uma reação de PCR segundo Saiki *et. al* (1988). Para isso foi desenhado um par de iniciadores que continham este sítio em suas extremidades 5' (Tabela 2). Dessa maneira o produto de PCR resultante desta reação terá em suas extremidades este sítio de reconhecimento.

Tabela 6: Iniciadores utilizados para a inserção de adaptadores a construção da Ts1-4.

Ts1 BamHI Direto	5' <u>GGATCC</u>ATCGATAAGCTTAAAGAAGG 3'
Ts1BamHI Reverso	5' <u>GGATCC</u>GATTCAAAGCTTACATTTGT 3'

Sublinhada a sequência do sítio de restrição BamHI

Para padronização de PCR, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento e variação na concentração de iniciadores. As temperaturas de anelamento tiveram variação em 6 temperaturas diferentes com intervalo de 2°C. No passo 3 (descrito a seguir) a variação foi de 58 a 68 °C e no passo 7 de 54 a 64°C. Foi testada a variação na concentração de iniciadores de 1 e 2 pmol.

A reação de PCR foi preparada como descrito abaixo:

Tampão IVb 5x	5 µL
DNTP's 1 Mm	2,5 µL
Taq DNA polimerase	0,2 µL
Iniciador direto 20 pmol/µL	0,3 µL
Iniciador reverso 20 pmol/µL	0,3 µL
Água ultrapura	16,7 µL
Volume final	25 µL

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

Foi usado o seguinte programa de termociclagem:

1. 95 °C por 4 minutos
2. 95 °C por 30 segundos
3. 58 - 68 °C por 30 segundos
4. 72 °C por 40 segundos
5. Os passos de 2 ao 4 foram repetidos por 5 vezes.
6. 95 °C por 30 segundos
7. 54 - 64 °C por 30 segundos
8. 72 °C por 40 segundos
9. Os passos de 6 ao 8 foram repetidos por 25 vezes.
10. 72 °C por 5 minutos
11. 4 °C ∞

4.6 Resolução Eletroforética em Gel de Agarose

O gel de agarose 1,5% ou 0,8% foi preparado utilizando-se 1,5 g ou 0,8 g de agarose em pó e completado o volume para 100 mL com solução tampão TAE (40 mM Tris-HCl pH7,5; ácido acético 20 mM, 1 mM EDTA pH 8,0) em seguida aquecido até a

completa dissolução da agarose. Após a solução de agarose atingir temperatura adequada para ser manipulada, ela foi colocada em uma “cama” com a adição de um pente até sua completa solidificação. Após a solidificação do gel, foi retirado o pente e o gel colocado na cuba para eletroforese vertical e coberto com tampão TAE.

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

Após a resolução, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 10 µg/100 mL por aproximadamente 20 minutos e fotografado sobre uma fonte de luz ultravioleta (Sambrook, *et. al.*, 1989).

4.7 Purificação de DNA a partir de gel de Agarose

Para purificação da banda de interesse (Ts1-4) foi realizada nova PCR repetindo o programa descrito acima com temperatura de anelamento de 60 – 56 °C, utilizando os iniciadores Ts1 BamHI direto e reverso (item 4.5).

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

A banda correspondente a Ts1-4 foi excisada do gel, após a eletroforese, com auxílio de uma lamina de bisturi e transferida para um microtubo (Axigen) de 1,5 mL. Foram adicionados 10 µL de solução “bind solution” para cada 10 mg de gel de Agarose, a seguir a mistura foi aquecida a 60 °C e agitada com auxílio de um vortex até a completa dissolução do gel.

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

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

4.8 Subclonagem do Produto de PCR da Ts1-4 ao vetor pGEM-T Easy

A ligação do produto de PCR correspondente a Ts1-4 purificada após PCR a partir do gel de agarose (item 4.7) ao vetor pGEM-T Easy foi realizado como descrito pelo fabricante:

Foi adicionado a um tubo de 0,5 mL 1 μL do vetor pGEM-T Easy 50 ng/ μL , 5 μL de tampão da T4 DNA ligase, 3 μL do inserto da Ts1-4 a 100 ng/ μL e 1 μL da enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação possui volume final de 10 μL .

A reação foi incubada a 4 °C por 16 horas, logo em seguida foi realizada eletrotransformação da ligação a *E. coli* linhagem XL1 Blue.

4.9 Eletrotransformação Bacteriana

Uma alíquota de 100 μL de *E. coli* linhagem XL1 Blue eletrocompetente, da marca Phoneutria, foram descongeladas em banho de gelo, após o descongelamento foi adicionado as células 100 ng de DNA plasmidial e deixado em repouso por 1 minuto em banho de gelo. Após este período as células foram transferidas cuidadosamente para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad). Durante todo este processo os recipientes das células foram mantidos em banho de gelo. A cubeta foi transferida para o eletroporador (Electroporator 2510, Eppendorff) e foi submetida a uma voltagem de 1800 mV, corrente de 25 μF , e resistência de 200 Ω , imediatamente foi adicionado as células 1 mL de meio

de cultura SOC (fabricante Phoneutria) e cuidadosamente as bactérias foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e deixadas em repouso por 1 hora a 37°C.

Após este período foram montadas placas de Petri com meio LB-ágar (1 % de Peptona, 0,5 % de Extrato de levedura, 1 % de NaCl, 2 % de ágar) com a concentração de antibiótico Ampicilina (Phoneutria) de 1 ul para cada 1 mL de meio. A quantidade de 100 µL da cultura de suspensão celular foram espalhados sob o meio LB-ágar contido na placa de Petri com a ajuda de uma alça de Drigalski e mantida sob incubação por 16 horas a temperatura de 37° C a fim de se obter colônias recombinantes resistentes ao meio seletivo.

4.10 PCR de Colônia

Esta PCR tem o objetivo de diagnosticar colônias contendo vetores portadores de inserto em meio a colônias que contêm o vetor sem o inserto da Ts1-4 de maneira mais rápida.

Foi preparada uma reação de PCR conforme a seguir:

Tampão IVb 5x	5 µL
DNTP's 1 mM	2,5 µL
Taq DNA pol.	0,2 µL
Iniciador M13 direto 20 pmol/µL	0,3 µL
Iniciador M13 reverso 20 pmol/µL	0,3 µL
Água ultrapura q.s.p.	16,7 µL
Volume final	25 µL

As colônias isoladas foram coletadas com auxílio de uma ponteira estéril, estriadas em uma placa com LB-ágar com mapa numerado e as ponteiras foram lavadas em 25µL da solução de PCR descrita acima, inoculando as bactérias na solução. Este procedimento foi realizado dentro de um fluxo laminar (Veco) previamente esterilizado.

A PCR foi submetida ao programa de termociclagem a seguir:

1. 95 °C por 4 minutos
2. 95 °C por 30 segundos
3. 58 °C por 30 segundos

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

A reação de PCR de Colônia foi submetida à resolução eletroforética em gel de Agarose 1,5 % conforme descrito anteriormente (item 4.6).

4.11 Extração Plasmidial por Lise Alcalina

Uma colônia bacteriana isolada confirmadamente positiva obtida na placa com antibiótico devido, foi selecionada e inoculada em um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio 2xYT com Ampicilina (1 uL/ 1 mL de meio), que foi incubado sob agitação a temperatura de 37° C por 16 horas.

Após este período a cultura foi centrifugada a 4.000 \times g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em 100 μ L de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e transferido imediatamente para um microtubo de 1,5 mL e agitado com um auxílio de um vortex (Quimis). A seguir foi adicionado 100 μ L de solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) e o tubo foi agitado por inversão até que a suspensão obtivesse uma consistência viscosa, caracterizando a lise celular. Foram adicionados 100 μ L de solução III (300 mM de acetato de sódio, 11,5% de ácido acético glacial) e mantido sob leve agitação, a suspensão foi incubada em banho de gelo por 10 minutos.

Os microtubos contendo a suspensão foram centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um microtubo de 1,5 mL novo. Foram adicionadas 0,6 vezes do volume do sobrenadante coletado com isopropanol 100 % (Merck) e deixados no gelo por 15 min para precipitação de impurezas. A solução foi centrifugada novamente a 13.200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial precipitado ao fundo do tubo foi lavado duas vezes com 0,5 mL de etanol a 70%. A seguir o DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuscitado com 50 uL de uma solução de TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0) contendo 10 μ g/mL de RNase e incubada a 37° C por 2 horas (Sambrook, *et. al.*, 1989).

Após este período o DNA plasmidial foi purificado pelo método de Fenol-Clorofórmio. Foi adicionada a solução com o DNA plasmidial 100 uL de TE e 100 uL de fenol e foi mantido sob agitação por 30 segundos, em seguida adicionado 100 uL de clorofórmio e mantido sob agitação por 30 segundos. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 3 min e a fase superior formada pela solução de DNA plasmidial foi transferida para outro tubo e foi adicionado 200 uL de clorofórmio, mantido sob agitação por 30 segundos e novamente centrifugada como descrito anteriormente. A fase superior foi novamente recolhida, precipitada com 10% do volume de acetato de sódio a 3 M e 2 volumes de etanol absoluto, incubadas em banho de gelo por 20 minutos e a seguir centrifugada a 13.200 rpm por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado duas vezes com 0,5 mL de etanol a 70% e deixado secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de solução TE.

4.12 Quantificação do DNA Plasmidial

O DNA plasmidial contido em solução de TE foi aplicado em um gel de agarose 0,8% juntamente com uma amostra quantificada de DNA e submetido à resolução eletroforética conforme descrito anteriormente (item 4.6).

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

4.13 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento a partir do DNA plasmidial foi utilizado 200 ng de vetor para cada reação (Sanger, *et. al.*, 1977). Foi adicionado a um microtubo de 0,5 mL 200 ng de vetor; 2 µL de iniciador a 0,8 pmol/µL; 0,5 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle; 1,5 µL de tampão BigDye Terminator v1.1; e água ultrapura (Phoneutria) para

completar o volume final de 10 μ L. Para o sequenciamento dos clones com o vetor pGEM-T Easy foram utilizados o iniciador M13 promotor e M13 terminador (Tabela 3).

Tabela 7: Sequencias dos iniciadores utilizados para reação de seqüenciamento dos clones em pGEM-T Easy.

M13 direto	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

As reações foram submetidas ao programa de termociclagem a seguir:

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

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

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

μL de etanol 70 % e novamente centrifugado a $2.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente.

O produto do Sequenciamento foi ressuspendido em $10 \mu\text{L}$ formamida de Hi-Dye e aplicado no sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

4.14 Análises das sequências obtidas

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

4.15 Digestão com Enzima de Restrição BamHI

Após o sequenciamento, um clone obtido contendo a sequência da Ts1-4 foi selecionado para o ensaio de restrição assim como o vetor pET 11a, utilizando-se a enzima BamHI.

Para cada $1 \mu\text{g}$ de DNA foi adicionado, $2 \mu\text{L}$ de tampão da enzima 10x concentrada, 1 unidade da enzima ($0,1 \mu\text{L}$), água ultrapura para completar o volume final de $20 \mu\text{L}$. A reação foi incubada a 37°C durante 2 horas.

Após incubação, o produto das reações de corte da sequência referente à Ts1-4 e do vetor de expressão pET 11a, foram precipitados e ressuspendidos em $10 \mu\text{L}$ de água ultrapura e aplicada a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

A banda correspondente a Ts1-4 e ao vetor linearizado foram purificadas do gel de agarose com o kit “Wizard PCR Preps” individualmente e quantificados conforme descrito anteriormente (item 4.7).

4.16 Ligação da sequência da Ts1-4 ao Vetor pET 11a

A ligação da sequência da Ts1-4 ao vetor pET 11a foi realizada segundo o protocolo do fabricante da enzima T4 DNA Ligase. Foram realizadas seis reações de ligação com variação na quantidade de inserto. Para cada reação manteve-se a quantidade de vetor (100ng/ μ L) – 1 μ L; a quantidade de tampão 10x – 1 μ L e a quantidade de T4 DNA ligase (150 μ g/ μ L) – 0,1 μ L; a quantidade de Ts1-4 foi crescente em cada reação sendo 0,5 μ L, 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L e 5 μ L; e foi adicionado água q.s.p 10 μ L.

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

4.17 Seleção de colônias positivas para Ts1-4 em pET 11a

Após eletrotransformação em *E. coli* XL1 Blue, 44 colônias foram selecionadas para PCR de colônia (item 4.10), com iniciadores T7 promotor e T7 terminador (Tabela 5), e foram repicadas em nova placa de petri identificada.

4.18 Verificação da fase de leitura dos clones positivos Ts1-4 em pET 11a

Para verificar a correta orientação da fase de leitura dos clones positivos para a PCR de colônia do item 4.17, repetiu-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente (item 4.10), mas para cada clone positivo utilizou-se os 3 pares de iniciadores:

- Iniciadores T7 promotor e terminador
- Iniciadores T7 promotor e Ts1 reverso
- Iniciadores Ts1 direto e T7 terminador.

A sequência do iniciador Ts1 direto e reverso se encontram na tabela 4 e do iniciador T7 promotor e terminador na tabela 5.

Tabela 8: Sequência dos iniciadores Ts1 direto e reverso

Ts1 direto	5'ATCGATAAGCTTAAAGAAGG 3'
Ts1 reverso	5' GATTCAAAGCTTACATTTGT 3'

4.19 Sequenciamento dos clones em correta fase de leitura para Ts1-4 em pET 11a

Os clones da Ts1-4 em correta fase de leitura foram coletados da placa de petri e submetidos à extração plasmidial por lise alcalina, como descrito anteriormente (item 4.11), o DNA plasmidial foi quantificado por gel de agarose e a reação de sequenciamento procedeu como descrito no item 4.13, porém os iniciadores utilizados foram o T7 promotor e T7 terminador como mostra a tabela abaixo.

Tabela 9: Sequências dos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento dos clones em pET 11a.

T7 promotor	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
T7 terminador	5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'

4.20 Expressão piloto da toxina recombinante Ts1-4

Após o sequenciamento dos vetores pET 11a contendo o inserto da Ts1-4, foi feita uma eletrotransformação de dois clones (23 e 32) nas linhagens de *E. coli* Origami (DE3) pLysS e BL21 (DE3), como descrito anteriormente (item 4.9), resultando em 4 placas de petri :

- 1) clone 23 em BL21
- 2) clone 23 em Origami 2
- 3) clone 32 em BL21
- 4) clone 32 em Origami 2

Uma colônia foi selecionada de cada placa e todas foram transferidas para uma única placa de Petri identificada. As quatro colônias foram pré-inoculadas individualmente em 10 mL de meio 2xYT caldo (1% de peptona, 1,6% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl) contendo 1µL/mL ampicilina e mantidas sob incubação a 37°C com agitação de 200 rpm durante 16 horas. Então, 100 µL de cada cultura crescida foi inoculada em 10 mL do mesmo meio e incubada à 37°C em agitação até que a densidade ótica à 600nm (OD₆₀₀) atingisse 0,5, por leitura em espectrofotômetro.

Foram testados para cada linhagem e vetor, a variação na temperatura (37°C ou 25°C) e indução ou não por IPTG (concentração final de 0,6 M), o tempo de expressão foi de 16 horas.

Desse modo para cada clone foram testadas 8 condições diferentes, culminando em 16 estratégias de expressão como mostra a tabela 6:

Tabela 10: Estratégias de expressão dos clones da Ts1-4

Clone 23	
25 °C	37 °C
BL 21 -	BL 21 -
BL 21 +	BL 21 +
Origami -	Origami -
Origami +	Origami +
Clone 32	
25 °C	37 °C
BL 21 -	BL 21 -
BL 21 +	BL 21 +
Origami -	Origami -
Origami +	Origami +

- : sem indução por IPTG , + : com indução por IPTG

As melhores condições para a expressão foram mantidas na expressão em larga escala de 1 litro de meio 2xYT. Neste caso, 10 mL de pré-inóculo foram vertidos em 1 L de meio com 1 mL de ampicilina.

4.21 Resolução Eletroforética SDS-PAGE da expressão piloto

Após a expressão piloto, os 16 tubos foram centrifugados à 4000 x g, 4 °C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 500 µL de Solução de Lise Bacteriana da marca Phoneutria.

Então 10 µL de cada estratégia de expressão foram aplicados em um gel SDS-PAGE 12%, como descrito no item 4.4.1.

4.22 Lise Bacteriana

Após a expressão em larga escala (1 L), a cultura foi dividida em 3 garrafas de 400 mL e centrifugada à $4.000 \times g$ e 4°C durante 20 minutos para a precipitação das bactérias, em seguida as células foram ressuspensas em 120 mL de Solução de Lise Bacteriana da marca Phoneytria, 40 mL para cada garrafa.

Seguiu-se um processo de lavagem do resíduo de meio de cultura nas bactérias. As bactérias ressuspensas foram transferidas para 3 tubos falcon de 50 mL e centrifugadas novamente à $4.000 \times g$ e 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 10 mL de Solução de Lise Bacteriana. Neste momento todas as bactérias foram transferidas para um único tubo falcon de 50 mL e centrifugadas nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e as bactérias novamente ressuspensas em 30 mL de solução de lise. Em todo o processo a solução de lise bacteriana foi mantida em 4°C .

A lise bacteriana foi realizada em Prensa Francesa, método de lise física que utiliza alta pressão para o rompimento celular. As bactérias ressuspensas em 30 mL de tampão de lise bacteriana foram imediatamente submetidas à lise em prensa francesa por 3 vezes consecutivas, sob pressão de 2000 psi. O extrato bacteriano foi mantido em gelo após a lise.

4.23 Purificação da toxina recombinante Ts1-4

O extrato bacteriano, obtido após a lise, foi submetido a um processo de lavagem dos restos celulares que consistiu de:

- Três ciclos de sonicação com três pulsos de 40% de amplitude e duração de 30 segundos
- Centrifugação à 4300 rpm, 4°C por 20 minutos
- Armazenamento do sobrenadante

- Ressuspensão do pellet com 30 mL de Solução de Lise Bacteriana – Phoneutria

Esse processo foi repetido por 7 vezes consecutivas e então amostras da expressão em larga escala, extrato bacteriano após lise, sobrenadantes das lavagens e pellet final foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 15%, nas mesmas condições descritas anteriormente (item 4.4.1), para visualização do processo de purificação da toxina recombinante Ts1-4.

4.24 Tentativa de solubilização da toxina Ts1-4

Após purificação parcial da toxina Ts1-4 foi realizado um teste de solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO). Uma pequena porção visível do pellet foi recolhida com uma espátula e solubilizada em DMSO 100%, a solução foi centrifugada à 13200 rpm, 25°C por 10 minutos e então amostras da solução antes da centrifugação, fração solúvel e insolúvel após centrifugação foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 12% (item 4.4.1) para visualização do comportamento da toxina recombinante Ts1-4 na presença de DMSO.

4.25 Quantificação da toxina recombinante Ts1-4 por SDS-PAGE

Para estimar a quantidade de toxina recombinante expressa foi utilizado um sistema de quantificação por intensidade de bandas em SDS-PAGE, no qual foram aplicadas em um gel quantidades conhecidas da proteína albumina de soro bovino (BSA) e quantidades desconhecidas da toxina Ts1-4, objetivando a correlação da intensidade das bandas de quantidade conhecida (BSA) com as bandas de quantidade desconhecida (Ts1-4).

Dessa forma foi aplicado em um gel SDS-PAGE 12% (item 4.4.1):

- BSA: 3 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg e 30 µg.

- Toxina Ts1-4: 1 µL (10x diluída), 0,5 µL, 1 µL, 2 µL e 5 µL.

4.26 Ensaio de Imunização

Para este experimento foram utilizados 6 coelhos (fêmeas) da raça Nova Zelândia pesando aproximadamente 2 Kg e com cerca de 4 meses. Os coelhos tiveram 4 porções do dorso depiladas para identificação da região das imunizações

Para obtenção do soro controle pré-imune, foi coletado 2 mL de sangue de cada coelho, por um corte superficial na orelha, 3 dias antes da primeira dose de imunógeno.

Foram montados 3 grupos de imunização com 2 animais por grupo:

- **Grupo 1: Toxina recombinante Ts1-4**
- **Grupo 2: Toxina Ts1 nativa**
- **Grupo 3: Peçonha bruta de *Tityus serrulatus***

Foram aplicados 4 doses de 100 µg de imunógeno, com intervalo de 10 dias entre cada dose. Os imunógenos foram preparados com 1 mL de Adjuvante de Freund's (Sigma), completo para 1ª dose e incompleto para as doses subsequentes. Em um microtubo de 2 mL foi homogeneizado, com auxílio de uma seringa conectada a agulha, 100 µg de imunógeno em 100 µL de PBS e 1 mL de Adjuvante de Freund's, até obtenção de uma consistência bem espessa. Essa massa foi aplicada via subcutânea nos 4 pontos do dorso do animal, 0,25 mL por ponto, previamente lavados com etanol 70%.

Nove dias após a 2ª e 3ª dose, foram coletados 2 mL de sangue dos coelhos e o soro foi titulado por ELISA. Sete dias após a 4ª e última dose 20 mL de sangue foram coletados e o soro foi caracterizado por ELISA.

Tabela 11: Esquema de Imunização dos coelhos com a toxina recombinante Ts1-4, toxina Ts1 nativa e peçonha bruta de *Tityus serrulatus*

Dia	Imunização	Sangria
	Coleta de soro pré-imune	-
		2 mL de sangue
1	1ª Dose de imunógeno 100 µg de imunógeno em 1 mL Adjuvante Completo via subcutânea	-
10	2ª Dose de imunógeno 100 µg de imunógeno em 1 mL Adjuvante Incompleto via subcutânea	-
19	1ª Coleta de soro neutralizante	-
		2 mL de sangue
20	3ª Dose de imunógeno 100 µg de imunógeno em 1 mL Adjuvante Incompleto via subcutânea	-
29	2ª Coleta de soro neutralizante	-
		2 mL de sangue
30	4ª Dose de imunógeno 100 µg de imunógeno em 1 mL Adjuvante Incompleto via subcutânea	-
37	3ª Coleta de soro neutralizante	-
		20mL de sangue

Após a 4ª dose de imunógeno o soro anti-Ts1-4 recombinante ainda não tinha atingido uma titulação adequada por ELISA, por isso nos coelhos deste grupo foi aplicada uma 5ª dose com 400 µg de imunógeno Ts1-4. A coleta do sangue deste grupo foi realizada 7 dias após a 5ª dose.

4.27 Sangria dos Coelhos

Uma das orelhas dos coelhos foi lavada com etanol a 70%. Foi passado Xilol na ponta da orelha para estimular a circulação local e quando a veia marginal aumentou de calibre foi feita uma pequena incisão na veia. Foram coletados 2 mL de sangue para obtenção de soro pré-imune, 2 mL de sangue após 2ª e 3ª doses e 20 mL de sangue após a 4ª ou 5ª dose, em um tubo de cônico plástico com volume de 15 mL, em seguida o sangramento da orelha foi estancado por compressão no local. Não foi adicionado anticoagulante ao sangue coletado.

4.28 Preparação do Soro dos Coelhos

O sangue recém coletado foi mantido a 4 °C por 1 hora para total coagulação. Com o auxílio de uma haste de metal estéril os coágulos foram descolados da parede do tubo em seguida centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura de 4 °C.

O soro, fase superior líquida, foi coletado em outro frasco e centrifugado novamente em microtubos de 1,5 mL a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e em seguida congelado a -20 °C.

4.29 ELISA

A placa de ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL de antígenos diluídos em tampão carbonato (15 mM de Na₂CO₃, 35 mM de NaHCO₃; pH 9,6) com volume final de 100 µL por poço e incubado durante 16 horas a 4°C. A placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem para ELISA (0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20). Em seguida a placa foi bloqueada com 100 µL de solução de bloqueio (2% de caseína em tampão salina fosfato-PBS) e incubada a 37 °C por 1 hora. Após quatro lavagens com solução de lavagem, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora com soro imune e pré-imune com diluições seriadas (de 1:100 a 1: 25600) em tampão de incubação (0,2% de caseína em PBS e 0,05% de Tween 20). A placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem e incubada a 37°C por 1 hora com conjugado anti-IgG de coelho ligado a peroxidase e diluído 1:10.000 em

tampão de incubação. A placa foi novamente lavada seis vezes e em seguida adicionados 100 µL por poço de solução de substrato [10 mL de tampão citrato (50 mM de Na₂HPO₄, 24 mM de ácido cítrico, pH da solução 5,0), 2 mg de Ortho-Phenylene-Diamina (OPD), 2 µL de peróxido de hidrogênio]. A placa foi deixada 20 minutos no escuro e a reação foi interrompida com 20 µL por poço de H₂SO₄ diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 492 nm em leitor de ELISA. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

As placas de ELISA foram sensibilizadas, cada uma com um antígeno, com a peçonha bruta de *T. serrulatus*, a toxina Ts1 nativa, a toxina Ts1-4 recombinante e também com proteínas bacterianas insolúveis, a fim de se testar a capacidade de reconhecimento dos soros com cada um dos antígenos. Foram testados os soros pré-imune, anti-peçonha bruta, anti-Ts1 nativa e anti-Ts1-4 recombinante.

4.30 Western Blot

Amostras de peçonha bruta de *T. serrulatus*, toxina Ts1 nativa, toxina Ts1-4 recombinante e proteínas bacterianas, foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE (item 4.4.1) e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm - Millipore), sob corrente de 100 V e 350 mA por 16 horas. As proteínas foram então submetidas ao reconhecimento do anticorpo primário como descrito por Guatimosin *et. al.* (2000). A membrana foi bloqueada por 1h em PBS contendo 0,3% de Tween 20 sob agitação à temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi então lavada três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e incubadas por duas horas sob agitação em temperatura ambiente com soro imune de interesse. A seguir a membrana foi novamente lavada por três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20. A membrana foi incubada com anticorpo conjugado anti-IgG de coelho ligado a peroxidase, na diluição de 1:5000 em PBS, por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação.. Seguiu-se três lavagens com PBST e duas lavagens com PBS e a reação foi revelada pela adição do substrato da peroxidase ligada ao conjugado contendo 0,5 mg/mL de diaminobenzidine (DAB) e 0,25 mg/mL de 4-cloronaftol, 8% de metanol e 0,042% de H₂O₂ 30% (Towbin *et. al.*, 1979).

4.31 Determinação da DL₅₀

Para a determinação da DL₅₀ (dose letal para 50% da população), doses crescentes de peçonha segundo um fator, no caso deste estudo 1.3, são inoculadas em grupos de camundongos com peso entre 18 g e 22 g. Após 24 horas são contadas as mortes e processado o cálculo da DL₅₀ realizado pelo método de Probitos. As doses da peçonha são diluídas com uma solução de PBS 1x concentrada e inoculados em cada camundongo (Karber, 1937).

Foram realizadas duas determinações de DL₅₀, uma para a peçonha bruta de *T. serrulatus* e outra para a toxina Ts1 nativa.

Para determinação da DL₅₀ da peçonha bruta foram utilizados 36 camundongos Swiss com peso entre 18 g e 22 g, que foram separados aleatoriamente em seis grupos com seis indivíduos cada. Um grupo recebeu apenas a solução de PBS/BSA 1% como controle (C-). Os outros cinco grupos receberam doses crescentes de veneno conforme a tabela 8 por via subcutânea.

Tabela 12: Doses da peçonha bruta de *T. serrulatus* utilizadas para determinação da DL₅₀ em camundongos, fator de 1.3.

Grupos	Doses de peçonha	
	µg/20g	
1	8,58	
2	11,15	
3	14,5	
4	18,85	
5	24,51	

Para determinação da DL₅₀ da toxina Ts1 nativa foram utilizados 30 camundongos Swiss com peso entre 18 g e 22 g, que foram separados aleatoriamente em seis grupos com cinco indivíduos cada. Um grupo recebeu apenas a solução de PBS/BSA 1% como controle (C-). Os outros cinco grupos receberam doses crescentes de veneno conforme a tabela 9.

Tabela 13: Doses da toxina Ts1 nativa de *T. serrulatus* utilizadas para determinação da DL50 em camundongos, fator de 1.3

Grupos	Doses de Ts1 nativa µg/20g
1	2,37
2	3,08
3	4,01
4	5,21
5	6,78

4.32 Soroneutralização

A soroneutralização foi realizada testando a capacidade de proteção dos soros hiperimunes contra, 2 e 5 DL50's da peçonha bruta de *T. serrulatus*, e de sua toxina Ts1 nativa. Foram utilizados os soros pré-imune, anti-peçonha bruta, anti-Ts1 nativa e anti-Ts1-4 recombinante.

Para cada antígeno (peçonha ou Ts1 nativa), foram utilizados quatro grupos (um grupo para cada soro) com oito camundongos Swiss fêmeas (18-22 g), por grupo. Foram incubados 100 µL de cada soro hiperimune de coelho por 1 hora a 37°C com 2 ou 5 DL50 de peçonha bruta ou de Ts1 nativa. Em seguida essa preparação de soro + peçonha ou soro+Ts1 nativa foi inoculada via subcutânea em cada camundongo. A contagem de sobreviventes foi realizada após 24 horas (Karber, 1937).

Resultados

5 Resultados

5.1 Fracionamento da peçonha bruta de *Tityus serrulatus* e purificação da toxina Ts1

O extrato bruto da peçonha, após cromatografia em CM-cellulose-52 pH 7,8, foi fracionado em 14 frações (Figura 16). O perfil obtido se assemelha muito ao obtido por Arantes *et al.* (1989).

Após a aplicação da amostra, durante a lavagem com tampão 0,01M de bicarbonato de amônio pH 7,8, ocorreu um problema com o sistema devido ao aumento de pressão que ocasionou a perda de 20 frações (tubos 56 ao 76) das 86 frações coletadas neste segmento, essa perda está representada no cromatograma por uma descontinuidade da linha de base. Essa perda não ocasionou maiores problemas, uma vez que a fração de interesse, que contém a toxina Ts1 pura, corresponde à última fração do cromatograma, designada fração XIV.

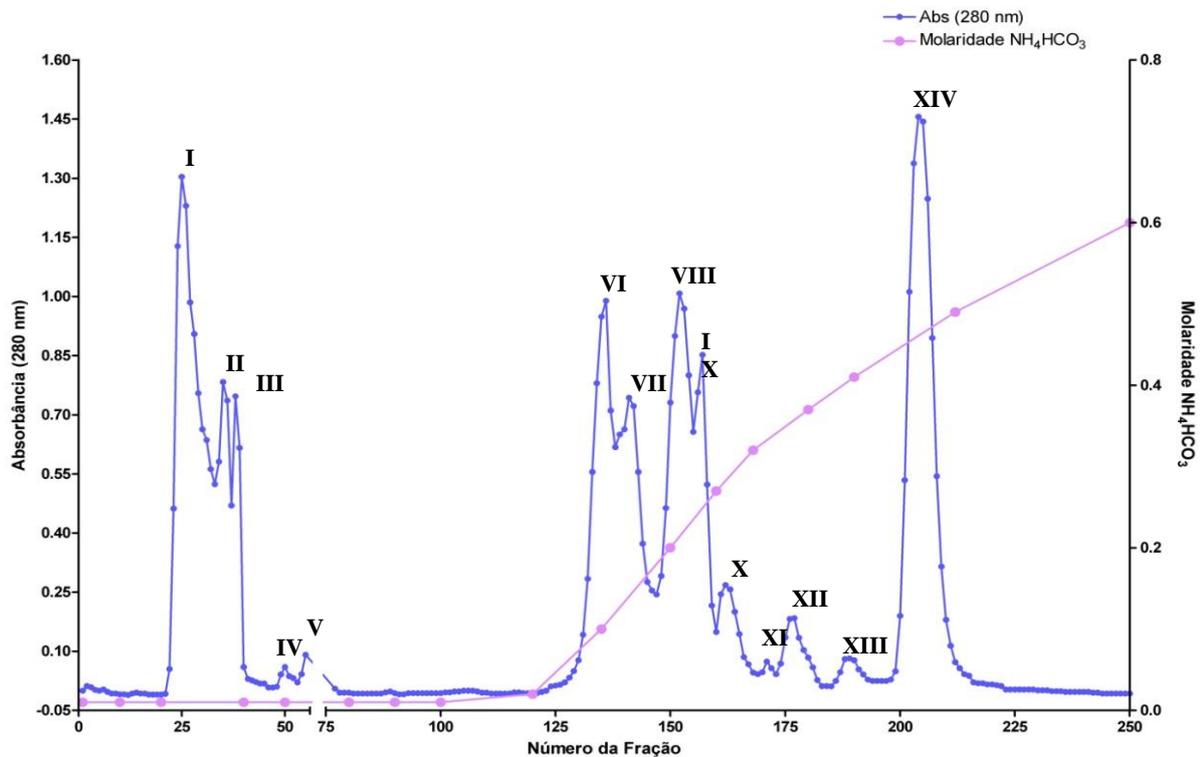


Figura 18: Cromatografia do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-cellulose-52 pH 7,8. A coluna (2,5 cm x 63 cm) foi equilibrada com tampão 0,01M de bicarbonato de amônio pH 7,8. A amostra (500 mg de peçonha) foi aplicada e 430 mL de tampão de equilíbrio foram passados sob um fluxo de 20 mL/h, posteriormente um gradiente convexo de concentração de 0,01M a 0,6M de tampão bicarbonato de amônio foi aplicado por 820 ml. Frações de 5mL /tubo foram coletadas à 4°C. A leitura das absorbâncias a 280nm de cada tubo foi realizada e a determinação do gradiente foi realizada por leitura da condutividade em tubos aleatórios.

5.2 Caracterização da fração XIV – Ts1

5.2.1 Eletroforese em gel SDS-PAGE

Para indicar a ausência de contaminantes na fração XIV, que corresponde a Ts1 purificada, foi aplicado em um gel SDS-PAGE 12,5% um a amostra de peçonha bruta e uma amostra da fração XIV cuja massa molecular esperada era de aproximadamente 7 KDa. Como mostrado na Figura 17 a fração XIV apresenta aparentemente um elevado

grau de pureza, pois na fração não se pode visualizar outras bandas, e sua massa molecular corresponde ao esperado, a banda correspondente à toxina Ts1 se encontra próxima a banda do padrão de peso molecular de 10 KDa.

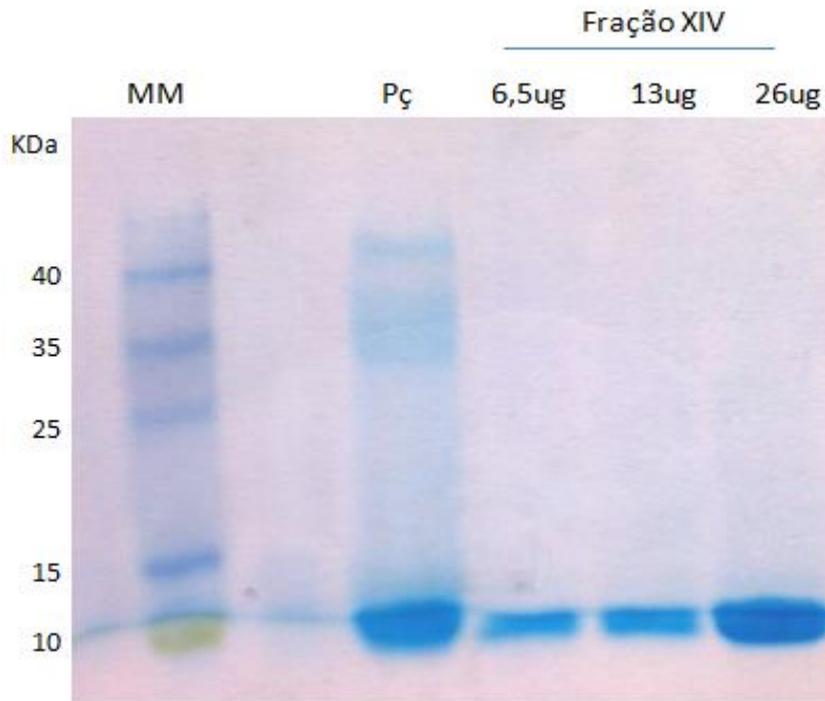


Figura 19: Análise da fração XIV obtida pelo fracionamento do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-cellulose-52 por PAGE com agentes desnaturantes. Condições: Gel 12,5% de acrilamida, corante Coomassie brilliant blue G-250 em água:metanol 1:1 (v/v), descorante 7% (v/v) ácido acético. Padrão de massa molecular (MM), extrato bruto da peçonha (Pç), Fração XIV com diferentes quantidades (6,5, 13 e 26 ug, respectivamente).

5.2.2 Determinação da massa molecular

Na análise realizada foi encontrado um composto de m/z média de 6885.29 (Figura 18). Infelizmente as condições do equipamento utilizado não nos permitiu chegar a melhores resoluções de análise, comprometendo a exatidão da m/z medida. Contudo a massa obtida para a fração XIV está bem próxima da massa molecular descrita para Ts1 de 6890.9 Da por Cologna *et al.* (2009). Com esta análise foi permitido visualizar que a amostra se encontra com elevado grau de pureza, o composto de massa 13773,042 que

aparece no espectro provavelmente não é um contaminante mas sim um dímero da toxina, uma vez que essa massa corresponde ao dobro da massa da toxina Ts1.

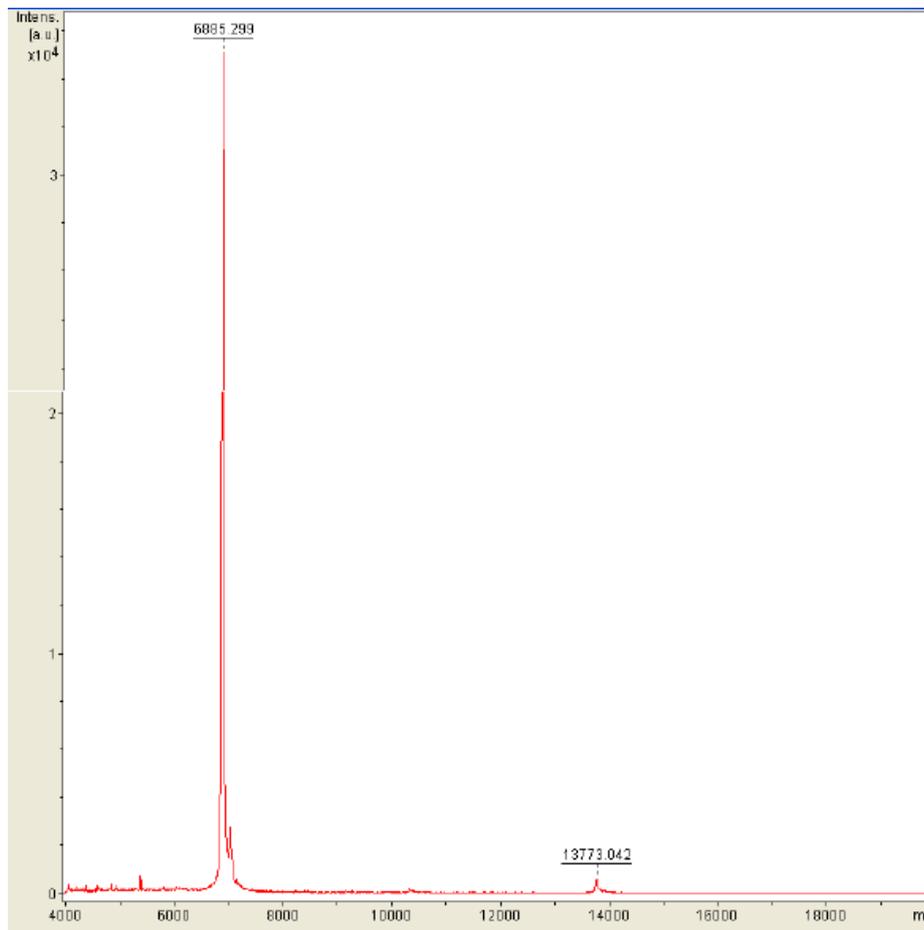


Figura 20: Espectro de massa da fração XIV. A fração analisada apresenta um composto com relação m/z de 6885,29 que corresponde à β -toxina Ts1 de *T.serrulatus*. Nota-se a considerável pureza da fração, já que o composto de m/z 13773,042 corresponde a um dímero da toxina.

5.3 Toxina Ts1 recombinante

5.3.1 Inserção de adaptadores a sequência da Ts1-4 e padronização da PCR

Para remoção do códon de parada prematuro presente no clone da Ts1-4 em pGEM-T Easy e conseqüente inserção do sítio de restrição da enzima BamHI, foi realizada uma PCR com iniciadores que se anelavam à sequência da toxina e adicionavam a ela o sítio da enzima BamHI.

Para padronização da PCR foi utilizada uma variação na concentração de iniciadores (1 e 2 pmol) e uma variação na temperatura de anelamento sendo:

1: 58 – 54 °C

2: 60 – 56 °C

3: 62 – 58 °C

4: 64 – 60 °C

5: 66 – 62 °C

6: 68 – 64 °C

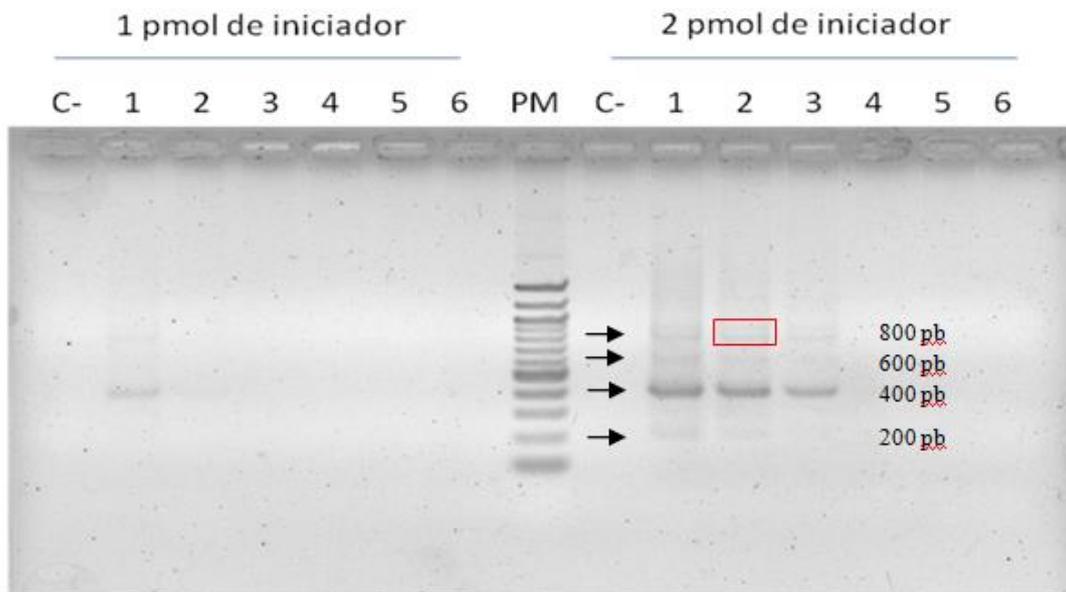


Figura 21: Inserção de adaptadores à sequência da Ts1-4 por PCR. Gel de agarose 1,5%, corrida com 100 V e 100 mA, corante brometo de etídio 10 µg/100 mL. No centro do gel o padrão de massa molecular (PM) de 100 pb da Amresco divide os produtos de PCR com 1 pmol de iniciadores dos produtos de PCR com 2 pmol de iniciadores, o controle negativo está representado por C- e os números de 1 a 6 se referem à variação de temperatura de anelamento, sendo: 1: 58 – 54 °C; 2: 60 – 56 °C; 3: 62 – 58 °C; 4: 64 – 60 °C; 5: 66 – 62 °C; 6: 68 – 64 °C. Em destaque o quadro vermelho com a banda de interesse de aproximadamente 800 pb com temperatura 2.

A sequência madura da toxina Ts1 de *Tityus serulatus* apresenta tamanho de 183 pb (Cologna *et al.*, 2009). Como o clone apresenta 4 sequências em tandem e o iniciador se anelava na sequência da toxina, durante a PCR foram formados produtos de 4 tamanhos distintos: aproximadamente **200 pb** – correspondente a amplificação de uma sequência; aproximadamente **400 pb** – correspondente a amplificação de 2 sequências; aproximadamente **600 pb** – correspondente a amplificação de 3 sequências e aproximadamente **800 pb** – correspondente a amplificação de 4 sequências da toxina, que é o produto de interesse (Figura 21).

A resolução eletroforética da PCR para inserção de adaptadores mostrou que a concentração de iniciadores mais eficiente é a de 2 pmol e as temperaturas de anelamento adequadas foram a 1, 2 e 3, sendo a temperatura 2: 60 – 56 °C escolhida para utilização em próximas PCRs. A concentração de 1 pmol de iniciadores se mostrou insuficiente para amplificação em todas as 6 temperaturas testadas, e com concentração de 2 pmol de iniciadores não foi visualizada nenhuma amplificação nas temperaturas 4, 5 e 6.

5.3.2 Purificação do DNA da toxina Ts1-4 a partir de gel de agarose

Para purificação da banda de interesse de 800 pb foi realizada uma PCR com os padrões estabelecidos na padronização acima: 2 pmol de concentração do iniciador e temperatura de anelamento de 60 -56 °C. A banda de interesse foi excisada do gel (Figura 22) e utilizada para ligação ao vetor pGEM-T Easy.

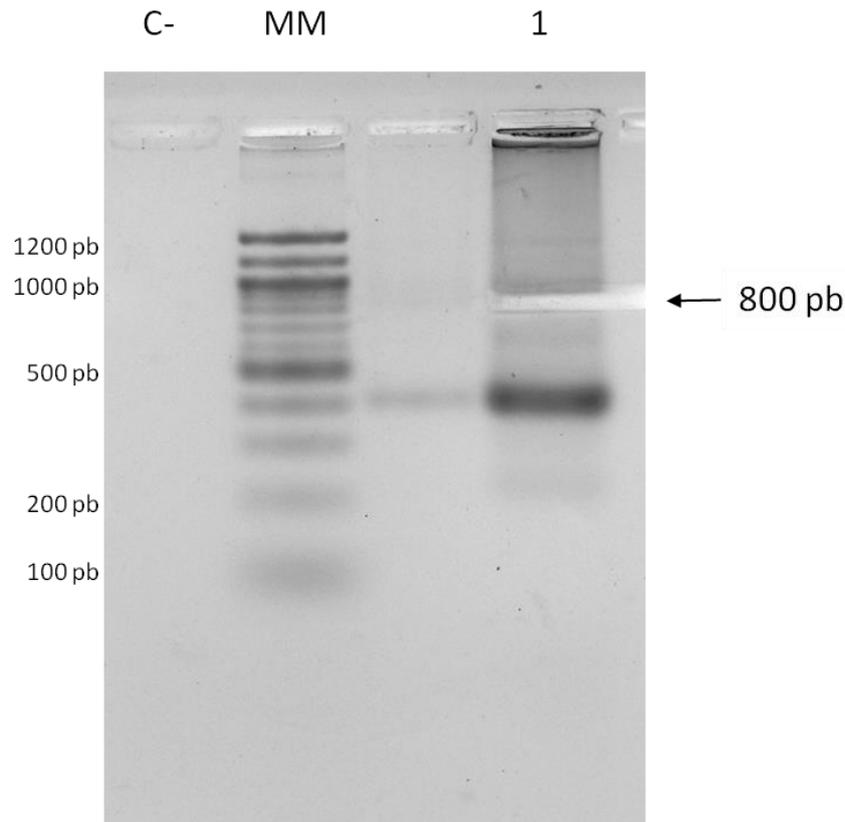


Figura 22: Purificação da banda referente à sequência da Ts1-4. Gel de agarose 1,5%, corrida com 100 V e 100 mA, corante brometo de etídio 10 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Controle negativo representado por C-, padrão de massa molecular (MM) de 100 pb da Amresco e em 1 o produto de PCR da Ts1-4 com iniciador Ts1 Bam HI direto e reverso e temperatura de 60 – 56 °C. A banda de 800 pb foi excisada do gel com auxílio de um bisturi.

Após purificação a banda foi digerida como descrito no item 4.7 e o produto submetido a nova resolução eletroforética para visualização da qualidade do DNA recuperado (dados não mostrados).

5.3.3 PCR de colônia – pGEM-T Easy com inserto Ts1-4

A banda de 800 pb purificada do gel e digerida foi ligada ao vetor pGEM-T Easy (item 4.8) e eletrotransformada em linhagem *E. coli* XL1 Blue (item 4.9). Nove colônias resultantes da eletrotransformação foram selecionadas para verificação das colônias portadoras do vetor com inserto da Ts1-4 através da PCR de colônia (item 4.10). O

iniciador M13, utilizado na PCR, se anela no vetor pGEM-T Easy, próximo ao sítio múltiplo de clonagem. Dessa forma foi amplificada nesta reação o sítio múltiplo de clonagem e regiões do vetor que o flanqueiam (Figura 23).

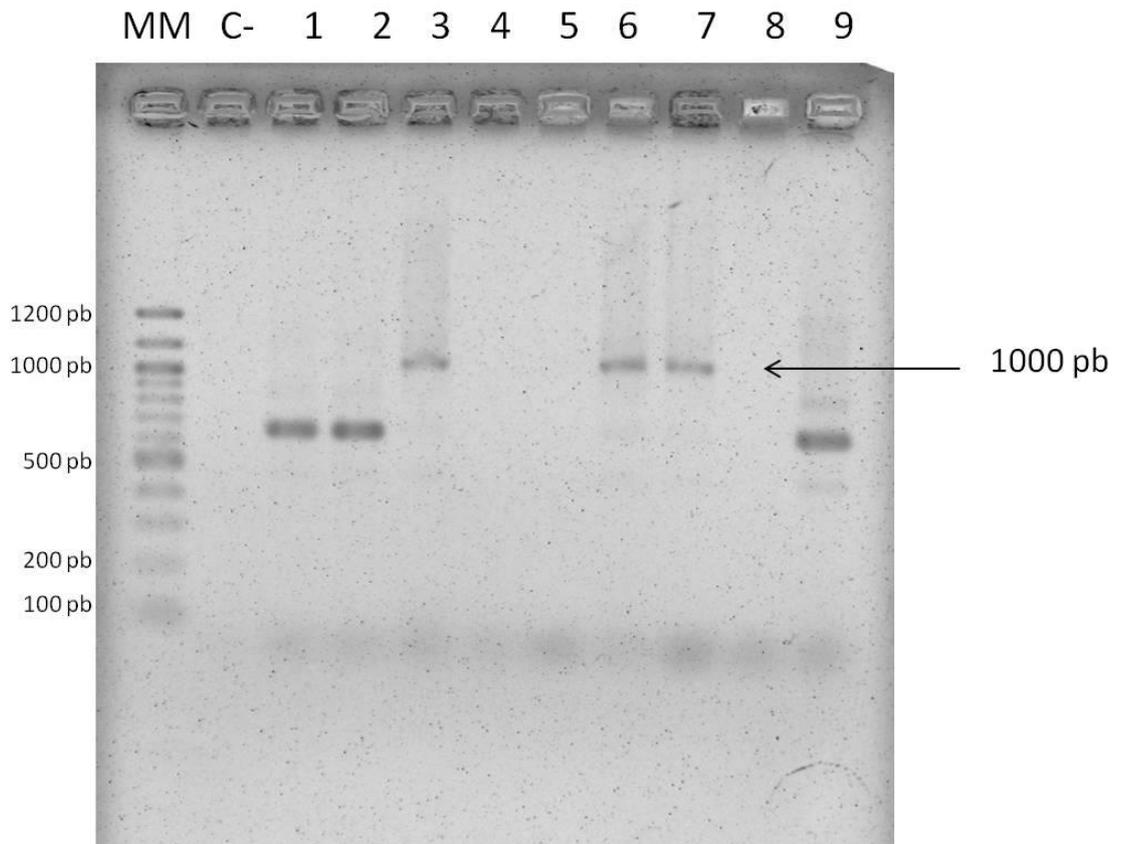


Figura 23: PCR de colônia – inserto da Ts1-4 em vetor pGEM-T Easy. Gel de agarose 1,5%, corrida com 100 V e 100 mA, corante brometo de etídio 10 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Controle negativo representado por C-, padrão de massa molecular (MM) de 100 pb da Amresco. Os números de 1 a 9 se referem a colônias isoladas utilizadas na PCR. O iniciador utilizado foi o M13. Destaque para 3 clones, 3, 6 e 7, que apresentaram uma banda de interesse de aproximadamente 1000 pb.

O fragmento da sequência da Ts1-4 ligada ao vetor pGEM-T Easy apresenta 1000 pb, uma vez que o fragmento da Ts1-4 possui 800 pb e o sítio múltiplo de clonagem do vetor aproximadamente 200 pb. Nos clones 3, 6 e 7 houve a amplificação de uma banda de aproximadamente 1000 pb, o que significa que o vetor recebido por estes clones contém o inserto da Ts1-4. Esses três clones foram então selecionados para sequenciamento.

5.3.4 Sequenciamento da ligação da sequência da Ts1-4 no vetor pGEM-T Easy-

Os clones 3, 6 e 7, positivos para PCR de colônia foram selecionados para o sequenciamento. Cada colônia foi crescida isoladamente e submetida à extração plasmidial por lise alcalina (item 4.11). O DNA plasmidial foi quantificado por gel de agarose (item 4.12) (dados não mostrados) e foram utilizados 200 ng de vetor para cada reação de sequenciamento. Os dados adquiridos pelo sequenciador automático ABI 3130 mostraram que o clone 3 (Figura 24) não estava em correta fase de leitura pois apresentava vários códons de parada prematuro dentro da sequência da Ts1-4, mas que os clones 6 (Figura 25) e 7 (Figura 26) estavam na fase de leitura correta e prontos para utilização.

Através deste processo identificou-se a correta sequência da Ts1-4, além dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição (Figuras 25 e 26). Todas as sequências obtidas apresentaram picos satisfatórios e ausência de linha de base alta, conferindo alta confiabilidade dos resultados.

As sequências geradas foram alinhadas com o banco de dados do Blast revelando similaridade com a sequência depositada da Ts1 em 99% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#453105>).

```

>Clone_3_F1+R1

TACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGC GAATTC
CTAGTGATT GGATCC GATTCA AAGCTT ACATTTGTTTCGTCGCTCTATCCCAAACCTTTCACCCAATTGGA
AGCCCGTAGCAGTAACACGCGGGCCAGGCGCAATAGCCCGATGAGCCCTTTTTAATTCCGCATTCTCTGC
CGCAGTATCCCGATGGTCTGATAAAGCAACTAAGTTTGC AACCTTCGTGATCACTGAGATAACCTTCTTT
AAGCTT ACATTTGTTTCGTCGCTCTATCCCAAACCTTTCACCCAATTGGAAGCCCGTAGCAGTAACACGCG
GGCCAGGCGCAATAGCCCGATGAGCCCTTTTTAATTCCGCATTCTCTGCCGAGTATCCCGATGGTCTGG
TAAAGCAACTAAGTTTGC AACCTTCGTGATCACTGAGATAACCTTCTTT AAGCTT ATCGAT GAATTC ATC
GAT AAGCTT AAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTACCAGACCATCGG
GATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCCGCGTGTACTG
CTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGT AAGCTT AAAGAAGGTTAT
CTCAGTGATCACGAAGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCG
GAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCCGCGTGTACTGCTACGGGCTTCCAAATTGGGT
GAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGT AAGCTT TGAATC GGATCC AATCACTAGT GAATTC GCGGC
CGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCAACGCGTTGGATGCATAGCTT GAGTA

>AAS_clone_3
GSDSKLTFVRRSIPNFHPIWKPVAVTRGPGAIAR stop ALFNSAFSAAVSRWSDKATKFATFVITEITFF
KLTfVRRSIPNFHPIWKPVAVTRGPGAIAR stop ALFNSAFSAAVSRWSGKATKFATFVITEITFFKLID
EFIDKLKEGYLSDHEGCKLSCFTRPSGYCGREGCIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCKLK
EGYLSDEGCKLSCFIRPSGYCGREGCIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCKL stop IGSN
H stopstop IRGRLQVDHMGELPTRWMHSLs

```

Figura 24: Sequenciamento clone 3 – Ts1-4 em pGEM-T Easy. Sequência nucleotídica da construção Ts1-4 em vetor pGEM-T Easy. Em azul o sítio de restrição da enzima BamHI, em amarelo o sítio da enzima HindIII, em verde o sítio da enzima EcoRI, em cinza a sequência da toxina Ts1 de *Tityus serrulatus*, em sublinhado a sequência do vetor pGEM-T Easy. A sequência da toxina Ts1 está flanqueada pelos sítios de HindIII. Na sequência de aminoácidos destaque para a sequência em vermelho, vários códons de parada prematuros em meio a sequência da Ts1-4.

>Clone_6_F1+R2

TGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGATCCATCGATAAGCT
 TAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGC
 GGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGC
 TTCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGA
 TCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA
 AAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCAAATTGGGTGAAAGTTT
 GGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAAGCTTGATATCGAATTCATCGATAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAG
 TGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATT
 AAAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCAAATTGGGTGAAAG
 TTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGACCAGGTTGCAAACCT
 TAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTAT
 TGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACA
 AATGTAAAGCTTGAATCGGATCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGA
 GCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT

>AAS_clone_6

GSIDKLEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLK
 EGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLKLIDKLE
 KEGYLSDEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLKLEGYLSD
 HEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLKLstopIGS

Figura 25: Sequenciamento clone 6 – Ts1-4 em pGEM-T Easy. Sequência nucleotídica da construção Ts1-4 em vetor pGEM-T Easy. Em azul o sítio de restrição da enzima BamHI, em amarelo o sítio da enzima HindIII, em verde o sítio da enzima EcoRI, em sublinhado a sequência do vetor pGEM-T Easy. A sequência da toxina Ts1 está flanqueada pelos sítios de HindIII. Na sequência de aminoácidos destaque para a correta fase de leitura da toxina recombinante Ts1-4.

>Clone_7_F1+R1

GACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGATCCATCGATAAGCTTAAAGAA
 GGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAG
 AATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCCAAA
 TTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAA
 GGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCT
 CATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAG
 AGCGACGAACAAATGTAAAGCTTGATATCGAATTCATCGATAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCAC
 GAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGG
 GCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGA
 TAGAGCGACGAACAAATGTAAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGC
 TTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCT
 GGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCCTTCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAA
 GCTTGAATCGGATCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCA
 ACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT

>AAS_clone_7

GSIDKLEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLK
 EGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLKLIDKLE
 KEGYLSDEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLKLEGYLSD
 HEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKCLKLstopIGS

Figura 26: Sequenciamento clone 7 – Ts1-4 em pGEM-T Easy. Sequência nucleotídica da construção Ts1-4 em vetor pGEM-T Easy. Em azul o sítio de restrição da enzima BamHI, em amarelo o sítio da enzima HindIII, em verde o sítio da enzima EcoRI, em sublinhado a sequência do vetor pGEM-T Easy. A sequência da toxina Ts1 está

flanqueada pelos sítios de HindIII. Na sequência de aminoácidos destaque para a correta fase de leitura da toxina recombinante Ts1-4.

5.3.5 Digestão com enzima de restrição Bam HI

Concomitantemente ao sequenciamento, foi realizada a reação de corte de três vetores pGEM-T Easy Ts1-4 (clones 3, 6 e 7) e pET 11a com a endonuclease BamHI para a liberação do inserto Ts1-4 do vetor pGEM-T Easy e linearização do vetor de expressão pET 11a.

Depois da reação de corte as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualização da liberação do inserto Ts1-4 (Figura 27) e linearização do vetor de expressão pET 11a (dados não mostrados).

A reação de corte dos vetores pGEM-T Easy Ts1-4 apresentou a liberação do inserto correspondente a Ts1-4 com tamanho aparente de 800 pb (Figura 27).

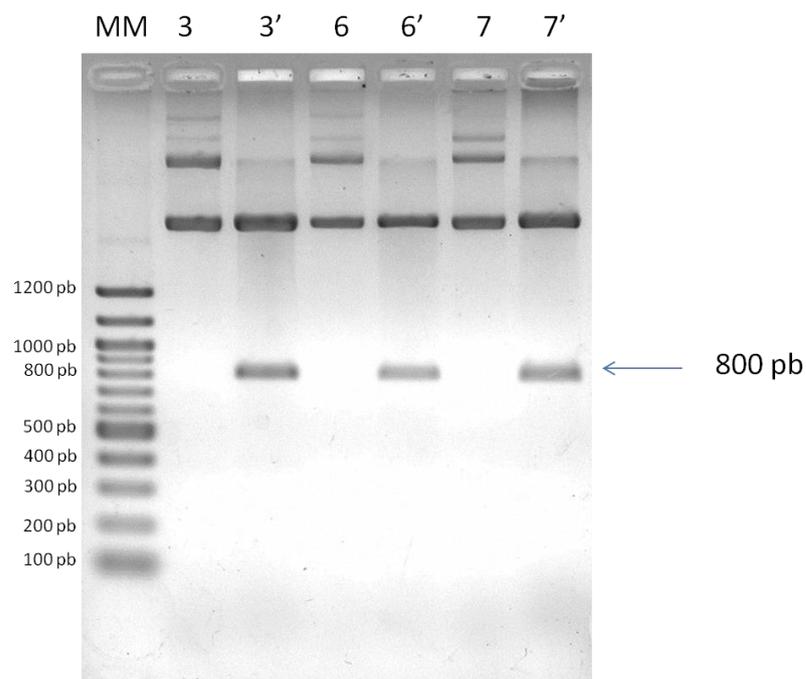


Figura 27: Digestão com enzima de restrição BamHI do vetor pGEM-T Easy Ts1-4. Gel de agarose 1,5%, corrida com 100 V e 100 mA, corante brometo de etídio 10 µg/100 mL. Padrão de massa molecular (MM) de 100 pb da Amresco. Em 3 e 3' estão representados respectivamente o clone 3 não digerido e digerido; em 6 e 6' está

representado respectivamente o clone 6 não digerido e digerido; em 7 e 7' representado respectivamente o clone 7 digerido e não digerido. Destaque para liberação do fragmento de 800 pb na digestão dos 3 clones – 3', 6' e 7'.

O produto da digestão do clone 6 – banda de 800 pb referente à sequência da Ts1-4 (Figura 27) - foi purificada do gel (item 4.7), assim como a banda referente ao vetor pET 11a linearizado (dados não mostrados), e ambos foram submetidos à ligação com a enzima T4 DNA ligase (item 4.16).

5.3.6 Seleção de colônias positivas para Ts1-4 em vetor de expressão pET 11a

O produto da ligação Ts1-4 e vetor pET 11a foi eletrotransformado em linhagem *E.coli* XL1 Blue. 44 colônias foram selecionadas para PCR de colônia (item 4.10), os iniciadores utilizados foram o T7 promotor e T7 terminador

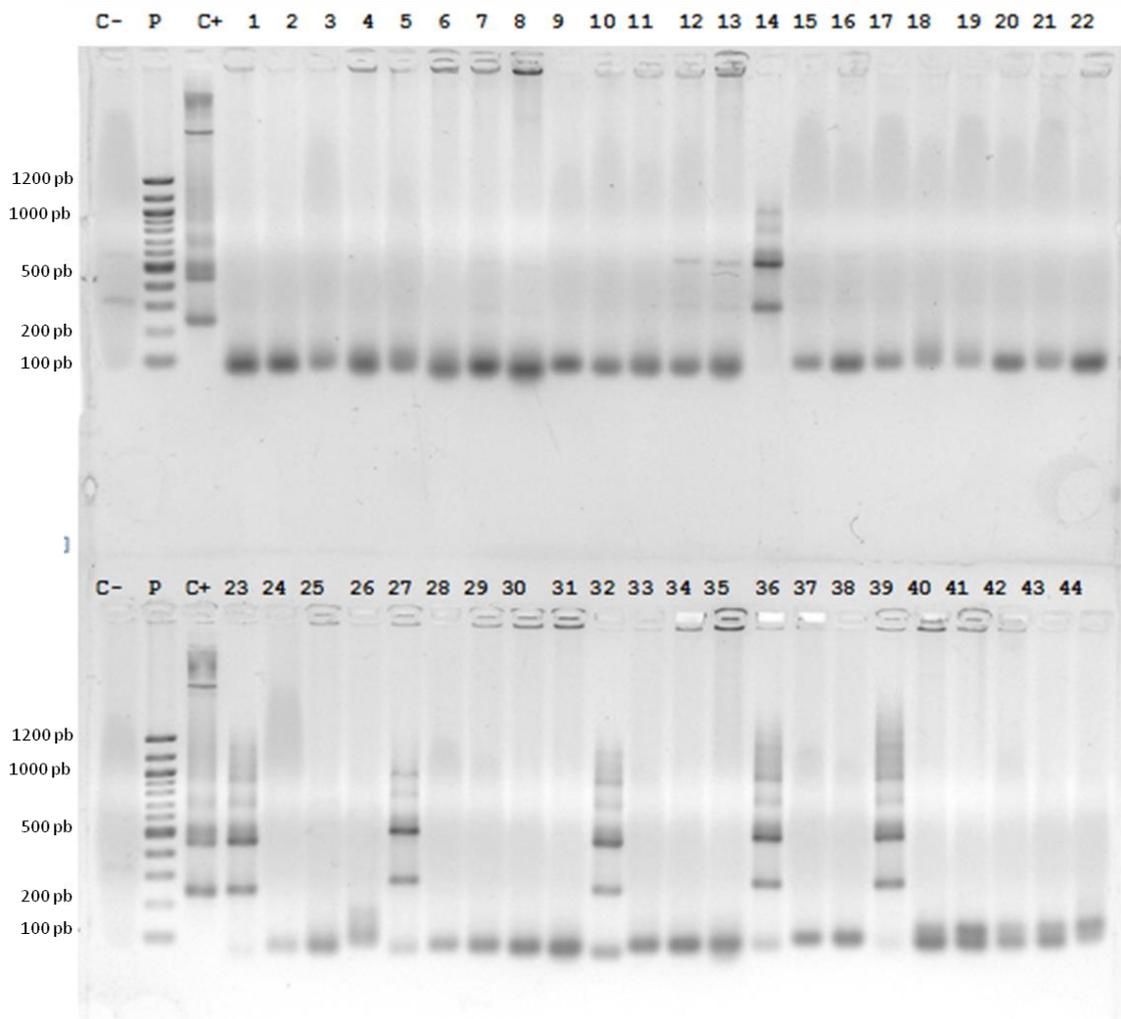


Figura 28: PCR de colônia para seleção de colônias positivas de Ts1-4 em vetor de expressão pET 11a.

Gel de agarose 1,5%, corrida com 100 V e 100 mA, corante brometo de etídio 10 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$. Padrão de massa molecular (P) de 100 pb da Amresco. Controle negativo representado por C-, controle positivo por C+ (Ts1-4 em pGEM-T Easy). De 1 a 44 estão representadas as colônias selecionadas para PCR, destaque para as colônias 14, 23, 27, 32, 36 e 39 que apresentam padrão de bandas equivalentes ao C + , indicando que receberam o vetor com inserto enquanto as demais colônias receberam o vetor vazio.

A figura 28 mostra que das 44 colônias utilizadas para PCR de colônia apenas 6 (14, 23, 27, 32, 36 e 39) apresentaram padrão de bandas equivalente ao vetor pET 11a com inserto da Ts1-4, enquanto as demais 38 colônias receberam o vetor pET 11a vazio. As colônias portadoras do vetor com inserto foram então selecionadas para verificação da fase de leitura através de nova PCR de colônia.

5.3.7 Verificação da fase de leitura dos clones TS1-4 em pET 11a por PCR de colônia

Para verificação da fase de leitura dos clones 14, 23, 27, 32, 36 e 39 foi realizada nova PCR de colônia e para cada clone foi utilizado 3 pares de iniciadores diferentes:

1: *T7 promotor e T7 terminador*

2: *T7 promotor e Ts1 reverso*

3: *Ts1 direto e T7 reverso*

O clone que amplificasse com os três pares de iniciadores estava em correta fase de leitura.

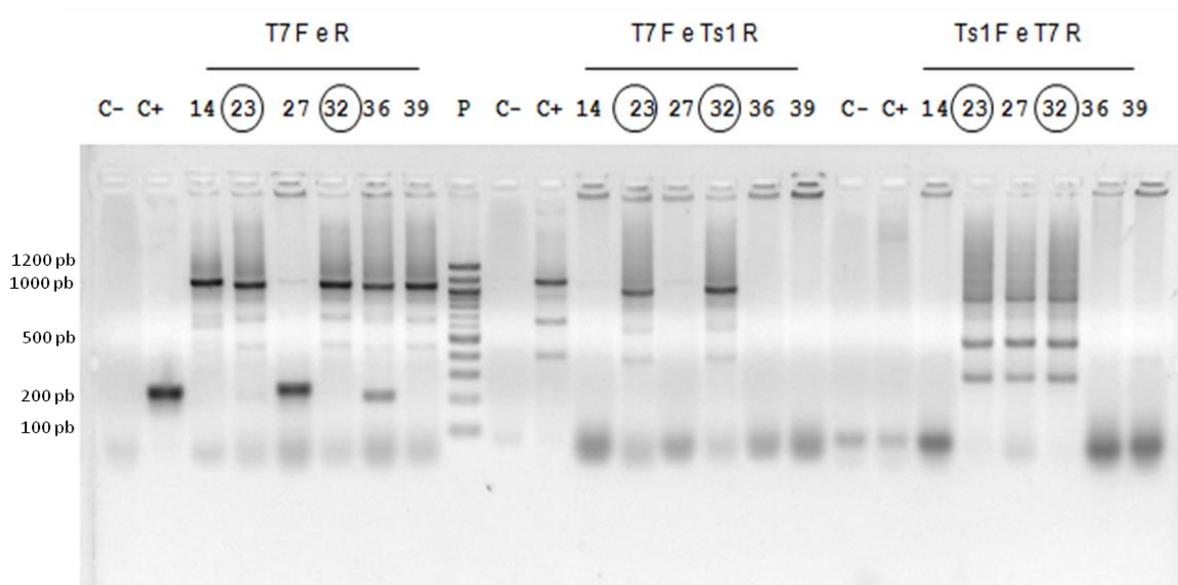


Figura 29: PCR de colônia para seleção de colônias positivas para Ts1-4 em vetor de expressão pET 11a. Gel de agarose 1,5%, corrida com 100 V e 100 mA, corante brometo de etídio 10 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$. Padrão de massa molecular (P) de 100 pb da Amresco. Controle negativo representado por C-, controle positivo por C+ (Ts1-4 em pGEM-T Easy). As colônias estão representadas por sua identificação 14, 23, 27, 32, 36 e 39 e os pares de iniciadores utilizados para cada reação estão indicados sobre as colônias. Destaque para colônias 23 e 32 que amplificaram com os três pares de iniciadores.

Os iniciadores T7 promotor e T7 terminador foram utilizados para amplificação de toda região do sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor bem como a região

flanqueadora do MCS, assim era esperada a amplificação de uma banda de aproximadamente 1000 pb, que se refere à sequência da Ts1-4 ligada ao vetor, e essa amplificação foi visualizada nas colônias 14, 23, 32, 36 e 39 (Figura 29). A colônia 27, apesar de ter sido amplificada na PCR anterior, não foi amplificada nesta PCR.

Os pares de iniciadores T7 promotor - Ts1 reverso e Ts1 direto - T7 terminador foram utilizados para verificação da orientação da fase de leitura dos clones. Em ambos os casos, era esperada a amplificação de bandas inespecíficas já que o iniciador Ts1 podia se anelar em 4 posições distintas (uma vez que a construção apresenta 4 cópias da toxina Ts1). Na Figura 29 é possível a visualização da amplificação com os iniciadores T7 promotor - Ts1 reverso apenas nas colônias 23 e 32, e com utilização dos iniciadores Ts1 direto - T7 terminador houve a amplificação das colônias 23, 27 e 32, sendo que a colônia 27 não foi amplificada com nenhum dos outros 2 pares de iniciadores utilizados.

Dessa forma as colônias 23 e 32, as únicas amplificadas com os três pares de iniciadores, foram selecionadas para a reação de sequenciamento a fim da verificação da integridade da sequência da Ts1-4 no vetor pET 11a.

5.3.8 Sequenciamento dos clones Ts1-4 em pET 11a em correta fase de leitura

As colônias 23 e 32 foram submetidas à extração plasmidial por lise alcalina (item 4.11), após extração o DNA plasmidial foi quantificado por gel de agarose (item 4.12) e 200 ng de DNA foram utilizadas para reação de sequenciamento (item 4.13). Os iniciadores utilizados foram o T7 promotor e T7 terminador.

As sequências obtidas apresentaram picos satisfatórios e ausência de linha de base alta, conferindo alta confiabilidade dos resultados. A Figura 30 mostra o resultado do sequenciamento do clone 32. O sequenciamento do clone 23, embora não tenha sido mostrado, apresentou os mesmos resultados. Esses resultados mostram que os 2 clones 23 e 32 estão aptos a expressão.

```

TATACATATGGGCTAGCATGAcTGGTGGACAGCAAATGGGGTCGCGGATCCCATCGATAAGCTTAaa
gAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGATGCAAACCTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACT
GCGGCAGAGAATGTGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTG
CTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAGCTTAAAGAA
GGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCG
GCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTACTGCTA
CGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAGCTTGATATCGAA
TTCCATCGATAAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTAGTTGCTTTA
TCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGC
CTGGCCCGCGTGTACTGCTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAAC
AAATGTAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTAGTTGCTTTATCA
GACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTG
GCCCGCGTGTACTGCTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAA
TGTAAAGCTTTGAATCGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAT

MASMTGGQQMGRGSIDKITQGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK
VWDRATNKKIKEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATN
KKIDIKIIDKIKEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRAT
NKKIKEGYLSDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKKI

```

Figura 30: Sequenciamento clone 32 – Ts1-4 em pET 11a. Sequência nucleotídica da construção Ts1-4 em vetor pET 11a. Em azul o sítio de restrição da enzima HindIII, em amarelo o sítio da enzima BamHI, em verde o sítio da enzima EcoRI, em cinza a sequência do vetor pET 11a. A sequência da toxina Ts1 está flanqueada pelos sítios de HindIII. Na sequência de aminoácidos destaque para a correta fase de leitura da toxina recombinante Ts1-4.

5.3.9 Expressão piloto da toxina Ts1-4

Os clones 23 e 32 foram eletrotransformados em linhagem E. coli BL21 e Origami pLysS (item 4.9). Uma colônia foi selecionada de cada eletrotransformação (23 BL21, 23 Origami, 32 BL21 e 32 Origami) para expressão. Foram testadas 8 estratégias de expressão para cada clone, culminando em 16 estratégias (Tabela 6).

O gel SDS-PAGE das estratégias utilizadas para cada clone estão mostrados nas figuras 31 e 32.

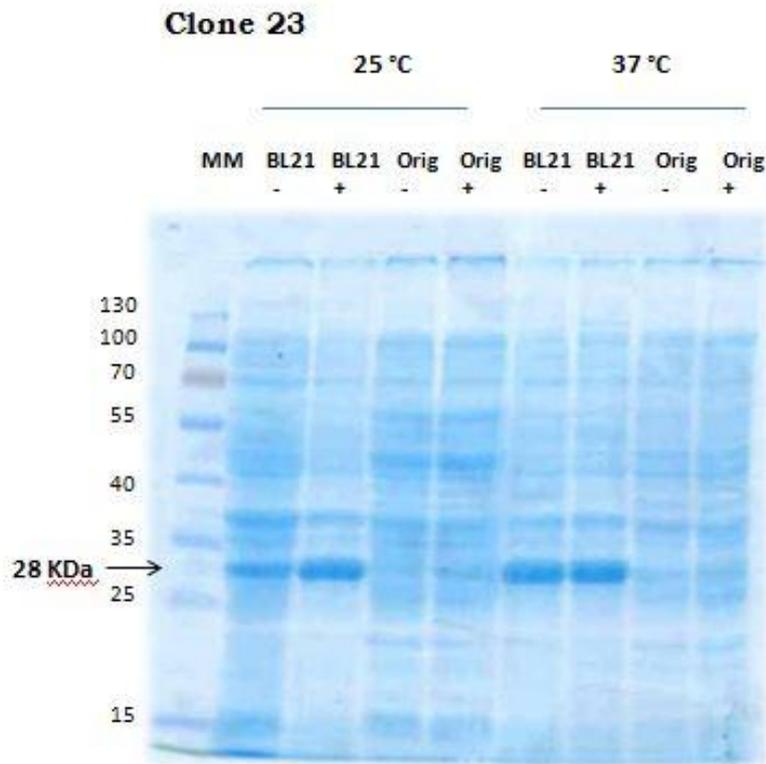


Figura 31: Expressão piloto da toxina recombinante Ts1-4 a partir do clone 23. Condições: Gel 12,5% de acrilamida, corante Coomassie brilliant blue G-250 em água:metanol 1:1 (v/v), decolorante 7% (v/v) ácido acético. Padrão de massa molecular (MM); BL21 -: Linhagem *E. coli* BL21 sem indução de IPTG; BL21 +: Linhagem *E. coli* BL21 com indução de IPTG; Orig -: Linhagem *E. coli* Origami sem indução de IPTG; Orig +: Linhagem *E. coli* Origami com indução de IPTG. A temperatura de expressão (25 °C ou 37 °C) estão identificadas acima das respectivas linhagens. Destaque para a banda de aproximadamente 28 KDa, que se refere a toxina Ts1-4 expressa.

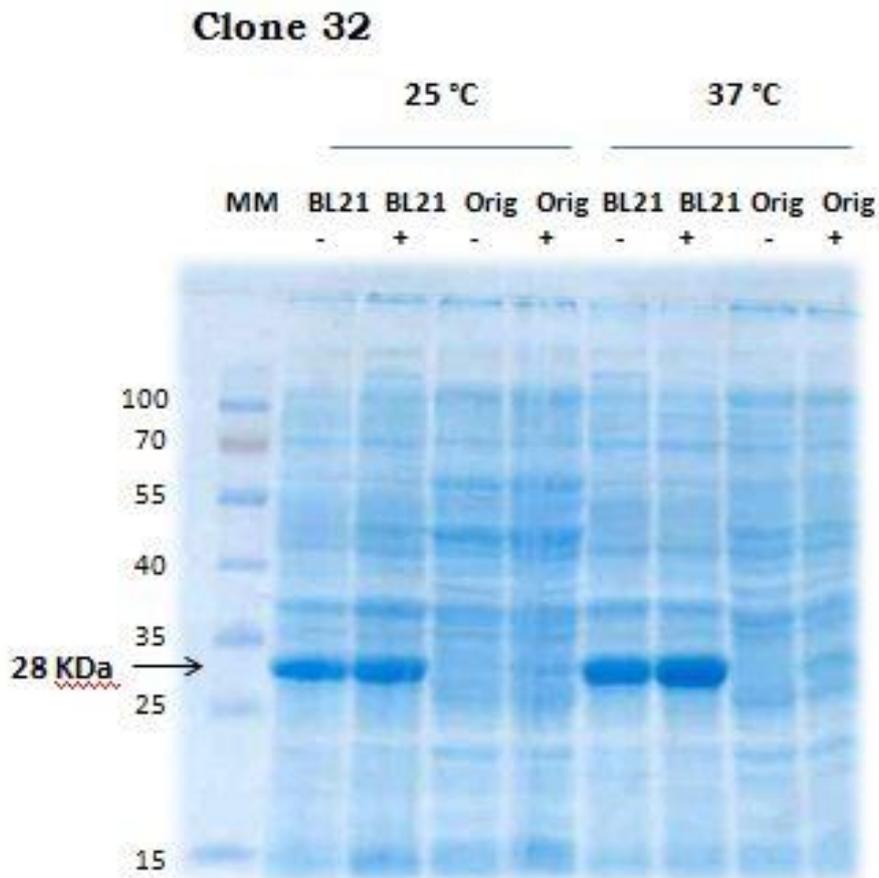


Figura 32: Expressão piloto da toxina recombinante Ts1-4 a partir do clone 32. Condições: Gel 12,5% de acrilamida, corante Coomassie brilliant blue G-250 em água:metanol 1:1 (v/v), descorante 7% (v/v) ácido acético. Padrão de massa molecular (MM); BL21 -: Linhagem *E. coli* BL21 sem indução de IPTG; BL21 +: Linhagem *E. coli* BL21 com indução de IPTG; Orig -: Linhagem *E. coli* Origami sem indução de IPTG; Orig +: Linhagem *E. coli* Origami com indução de IPTG. A temperatura de expressão (25 °C ou 37 °C) estão identificadas acima das respectivas linhagens. Destaque para a banda de aproximadamente 28 KDa, que se refere a toxina Ts1-4 expressa.

Com a resolução eletroforética da expressão piloto, pode-se visualizar que ambos os clones (23 e 32) expressaram a toxina de tamanho esperado (28 KDa) apenas em linhagem BL21, a variação de temperatura e indução com IPTG, não alteraram de forma expressiva o rendimento da expressão. Em linhagem Origami não houve expressão com nenhuma das condições testadas.

Dessa forma, foi escolhida para expressão em larga escala o clone 32 em BL21, expressão à 37 °C com indução de IPTG.

5.3.10 Purificação da toxina Ts1-4 recombinante

Após expressão em larga escala da toxina recombinante Ts1-4 a cultura foi submetida à lise bacteriana (item 4.22) e posterior purificação da toxina expressa através de lavagens consecutivas do extrato bacteriano (item 4.23). A Figura 33 mostra o processo de purificação da toxina Ts1-4 recombinante.

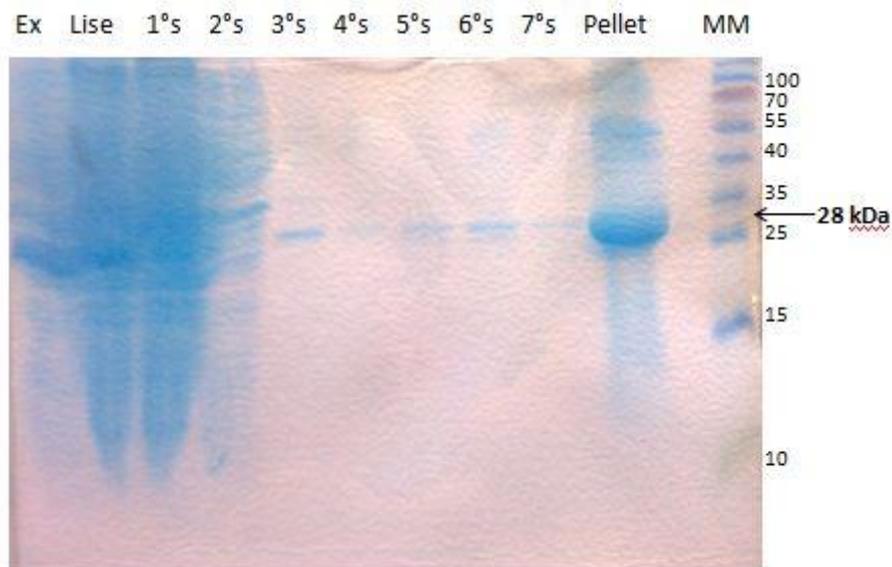


Figura 33: Purificação da toxina recombinante Ts1-4. Condições: Gel 12% de acrilamida, corante Coomassie brilliant blue G-250 em água:metanol 1:1 (v/v), descorante 7% (v/v) ácido acético. Ex: expressão do clone 32; Lise: extrato bacteriano após lise em prensa francesa; 1ºs a 7ºs : 1º ao 7º sobrenadante de lavagem do pellet; Pellet: pellet final após 7 lavagens com grande quantidade de toxina Ts1-4 recombinante de 28 KDa; MM: padrão de massa molecular.

A purificação da Ts1-4 (Figura 33) mostra a grande concentração da toxina no pellet. Nos sobrenadantes de lavagens percebe-se a solubilização de uma pequena quantidade da toxina. Mesmo após várias lavagens, ainda há a presença de proteínas bacterianas junto com a toxina recombinante. Como a Ts1-4 é formada em corpos de inclusão (insolúvel) sua limpeza com alto grau de pureza se torna bem dificultada.

Contudo o rendimento da expressão foi bem satisfatório, pois a banda equivalente a toxina Ts1-4 foi bem intensa no gel de poliacrilamida.

5.3.11 Tentativa de solubilização da toxina recombinante Ts1-4 em DMSO

Após purificação parcial da toxina Ts1-4 foi realizado um teste de solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO). Uma pequena porção visível do pellet foi recolhida com uma espátula e solubilizada em DMSO 100%, a solução foi centrifugada à 13200 rpm, 25°C por 10 minutos e então amostras da solução antes da centrifugação, fração solúvel e insolúvel após centrifugação foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 12% (item 4.4.1) para visualização do comportamento da toxina recombinante Ts1-4 na presença de DMSO (Figura 34).

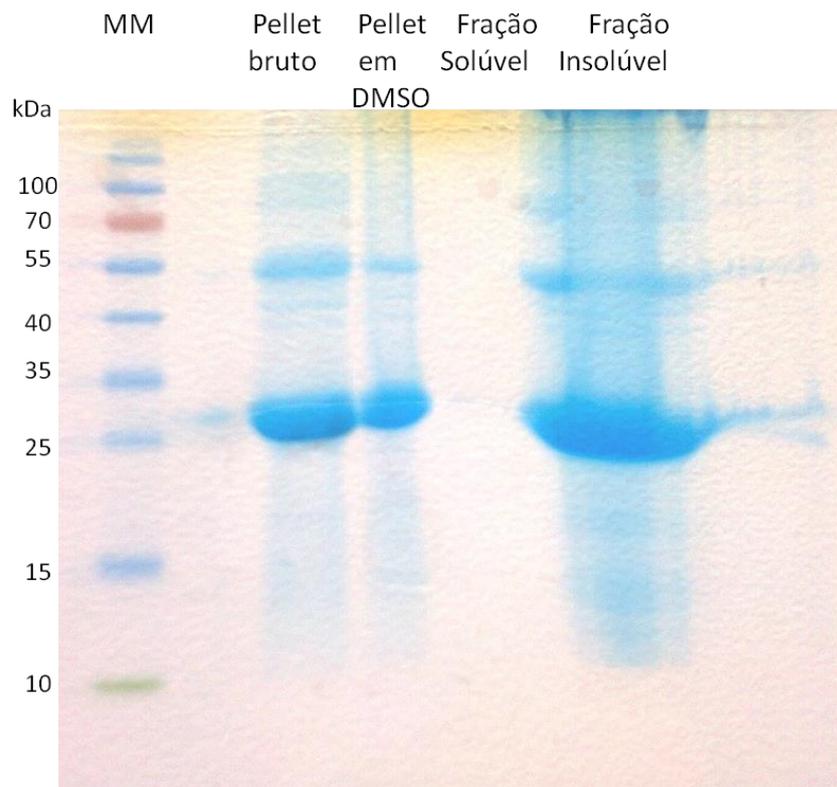


Figura 34: Gel SDS-PAGE tentativa de solubilização da Ts1-4 em DMSO. Condições: Gel 12% de acrilamida, corante Coomassie brilliant blue G-250 em água:metanol 1:1 (v/v), descorante 7% (v/v) ácido acético. MM – padrão de massa molecular; Pellet bruto – Ts1-4; Pellet em DMSO- Ts1-4 solubilizada em DMSO; Fração solúvel – fração solúvel após centrifugação; Fração insolúvel- pellet formado após centrifugação. A Ts1-4 possui 28 KDa e é a banda de maior intensidade no gel.

O DMSO, mesmo sendo um solvente muito forte, não foi capaz de promover nenhuma solubilização da toxina recombinante. Como pode ser visualizado na Figura 34 nem a Ts1-4 nem as proteínas bacterianas foram solubilizadas em DMSO, todas permaneceram na fração insolúvel após a centrifugação.

Dessa maneira será utilizada a toxina Ts1-4 insolúvel e parcialmente purificada para os ensaios de neutralização.

5.3.12 Quantificação da toxina recombinante por SDS-PAGE

Para estimar a quantidade de toxina recombinante expressa foi utilizado um sistema de quantificação por intensidade de bandas em SDS-PAGE, no qual foram aplicadas em um gel quantidades conhecidas da proteína albumina de soro bovino (BSA) e quantidades desconhecidas da toxina Ts1-4, objetivando a correlação da intensidade das bandas de quantidade conhecida (BSA) com as bandas de quantidade desconhecida (Ts1-4).

Dessa forma foi aplicado em um gel SDS-PAGE 12% (item 4.4.1):

- BSA: 3 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg e 30 µg.
- Toxina Ts1-4: 0,1 µL, 0,5 µL, 1 µL, 2 µL e 5 µL.

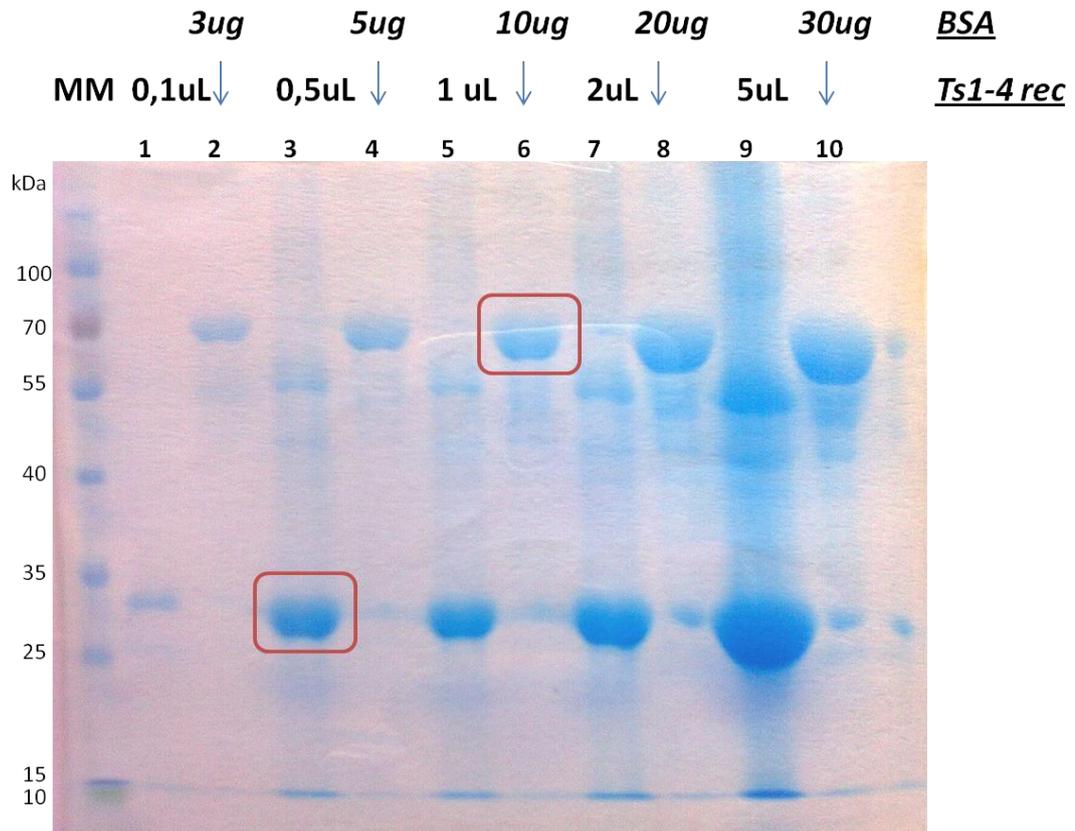


Figura 35: Gel SDS-PAGE quantificação da toxina recombinante Ts1-4 . Condições: Gel 12% de acrilamida, corante Coomassie brilliant blue G-250 em água:metanol 1:1 (v/v), decolorante 7% (v/v) ácido acético. MM – padrão de massa molecular; Canaletas intercaladas com Ts1-4 (1,3,5,7 e 9) e BSA (2,4,6,8 e 10) como indicado acima da figura. As bandas destacadas apresentaram a mesma intensidade e foram utilizadas para correlação de peso.

A toxina Ts1-4 apresenta peso de 28 kDa e corresponde então as bandas de menor massa com maior intensidade no gel, já o BSA apresenta peso de 66,5 kDa e corresponde as bandas de maior peso com maior intensidade no gel. Observando a figura 34 pode-se concluir que as bandas que apresentaram maior correlação de peso foram as das canaletas 3 e 6 que correspondem a 0,5 µL de Ts1-4 e 10 µg de BSA repectivamente. Desse modo foi padronizada a quantificação da Ts1-4 como sendo 20 µg/µL, a partir de uma amostra concentrada de 1 mL que foi o resultado de 1 L de expressão. Assim estimou-se a produção de 20 mg de toxina recombinante por litro de expressão.

Essa é uma forma bem grosseira de quantificação, contudo foi a única forma de se estimar a quantidade de proteína recombinante visto que sua forte insolubilidade impedia sua quantificação por métodos de dosagem de proteínas.

5.3.13 Titulação e reatividade dos soros obtidos na Imunização

Os soros obtidos na imunização foram titulados a cada sangria, contra seu próprio antígeno, para que fosse acompanhada a produção de soro pelos coelhos. Os coelhos imunizados com peçonha bruta e toxina Ts1 nativa receberam 4 doses de imunógeno, mas já alcançaram título do soro adequado na 3ª dose. Os coelhos imunizados com Ts1-4 recombinante após a 4ª dose de imunógeno ainda não tinham alcançado a titulação adequada do soro, por isso lhes foi aplicada uma 5ª dose com grande quantidade de imunógeno, assim o título foi alcançado.

Um fato interessante foi o salto do título obtido pela imunização com a Ts1 nativa. Após aplicação da 1ª e 2ª dose não foi observada a produção de anticorpos contra a Ts1, porém com a aplicação da 3ª dose a produção de anticorpos atingiu um título muito alto, que permaneceu na 4ª dose. O mesmo foi observado para a toxina Ts1-4 recombinante, até a 4ª dose não houve produção de anticorpos e após a 5ª dose um título máximo foi observado. Apenas os animais imunizados com a peçonha bruta apresentaram uma produção gradual de anticorpos ao longo das doses aplicadas.

A reatividade dos soros foi testada contra os diversos antígenos. Foram utilizadas quatro placas, cada uma sensibilizada com um antígeno, e todos os soros testados em cada placa. Os antígenos utilizados foram peçonha bruta, Ts1 nativa, Ts1-4 recombinante e proteínas bacterianas insolúveis. Os soros utilizados foram anti-peçonha, anti-Ts1 nativa, anti-Ts1-4 recombinante e soro pré-imune.

Na placa sensibilizada com peçonha bruta observa-se alto reconhecimento do soro-anti-peçonha bruta, reconhecimento intermediário do soro anti-Ts1 nativa e nenhum reconhecimento do soro anti-Ts1-4 recombinante e do soro pré imune (Figura 36).

Placa Peçonha bruta X Soros última dose

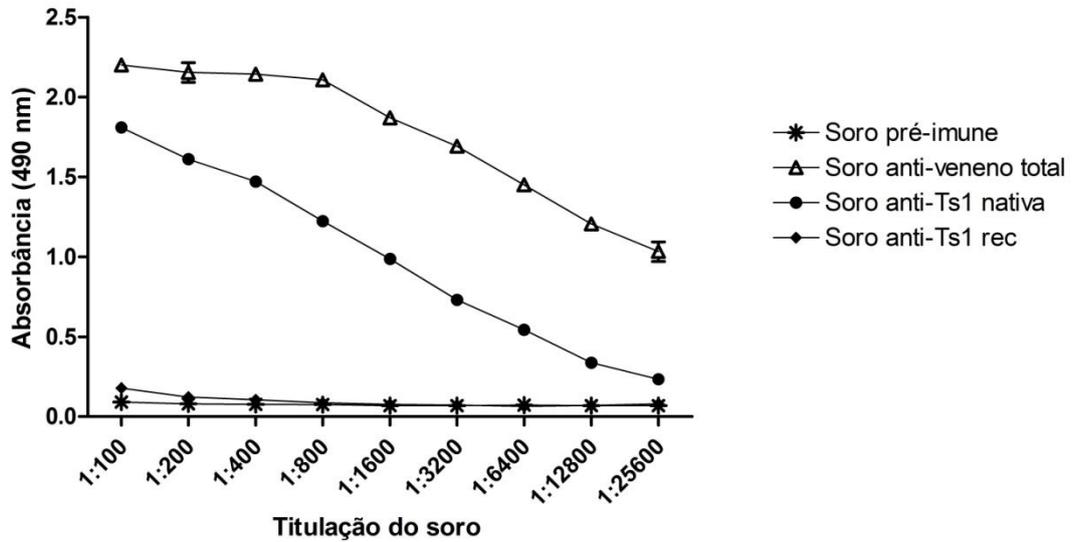


Figura 36: ELISA de reatividade Peçonha bruta X Soros diversos. . Placa sensibilizada com peçonha bruta. Soros utilizados da última dose (anti-peçonha e anti-Ts1 nativa: 4ª dose; anti-Ts1-4 recombinante: 5ª dose). Observa-se alto reconhecimento do soro-anti-peçonha bruta, reconhecimento intermediário do soro anti-Ts1 nativa e nenhum reconhecimento do soro anti-Ts1-4 recombinante e do soro pré imune.

Na placa sensibilizada com Ts1 nativa observa-se alto reconhecimento tanto do soro anti-Ts1 quanto do soro anti-peçonha bruta, contudo o soro anti Ts1-4 recombinante continuou não reconhecendo a toxina nativa, assim como o soro pré-imune (Figura 37).

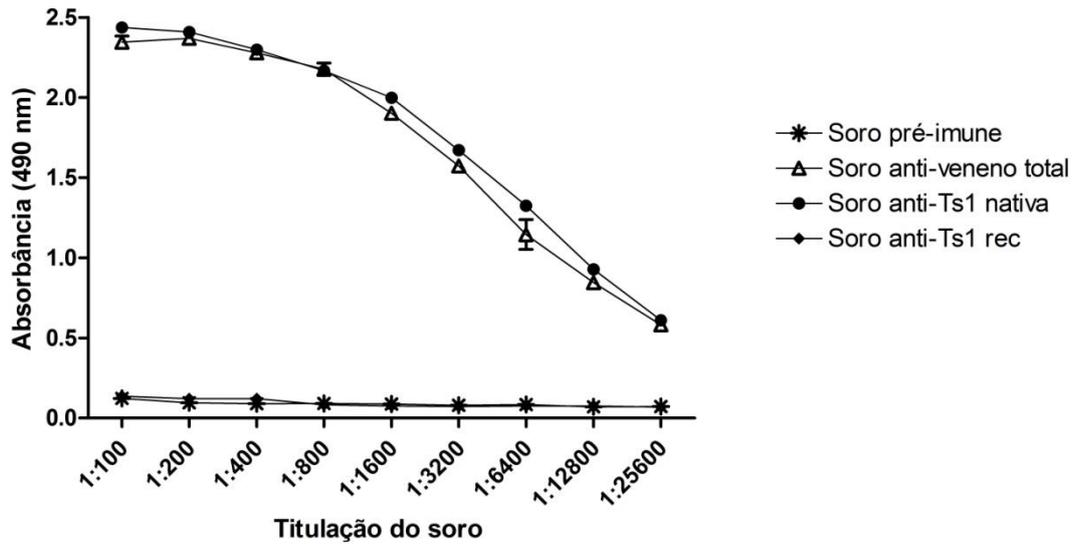


Figura 37: ELISA de reatividade Ts1 nativa X Soros diversos. . Placa sensibilizada com toxina Ts1 nativa. Soros utilizados da última dose (anti-peçonha e anti-Ts1 nativa: 4ª dose; anti-Ts1-4 recombinante: 5ª dose). Observa-se alto reconhecimento tanto do soro anti-Ts1 quanto do soro anti-peçonha bruta, contudo o soro anti Ts1-4 recombinante não reconheceu a toxina nativa, assim como o soro pré-imune.

Na placa sensibilizada com a toxina Ts1-4 recombinante o soro anti-Ts1-4 apresentou alto reconhecimento, o soro anti-peçonha apresentou reconhecimento intermediário e tanto o soro anti-Ts1 nativa quanto o soro controle pré-imune apresentaram baixo reconhecimento (Figura 38).

Placa Ts1-4 recombinante X Soros última dose

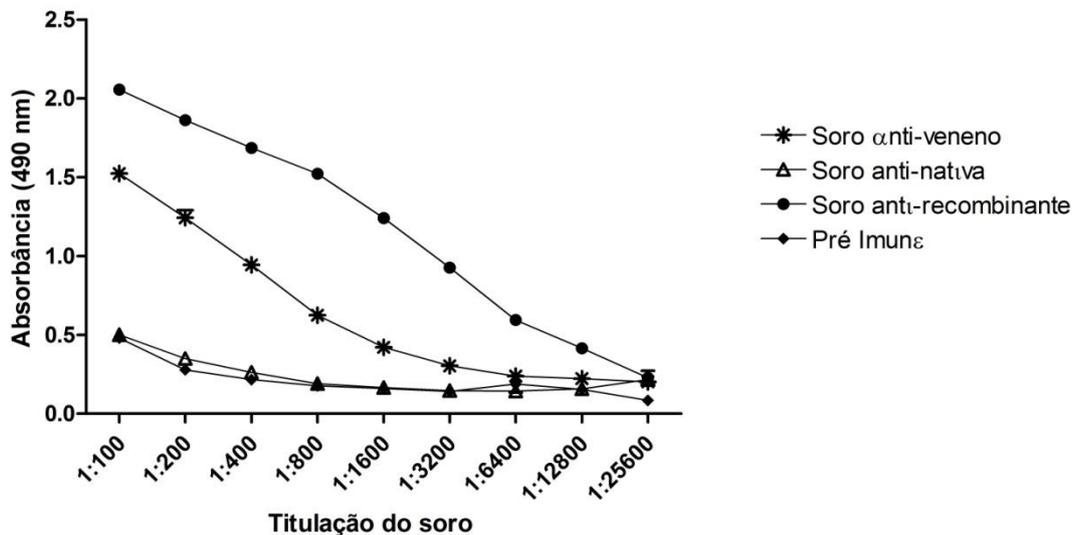


Figura 38: ELISA de reatividade Ts1-4 recombinante X Soros diversos. . Placa sensibilizada com toxina Ts1-4 recombinante. Soros utilizados da última dose (anti-peçonha e anti-Ts1 nativa: 4ª dose; anti-Ts1-4 recombinante: 5ª dose). Observa-se alto reconhecimento do soro anti-Ts1-4, o soro anti-peçonha apresentou reconhecimento intermediário e tanto o soro anti-Ts1 nativa quanto o soro controle pré-imune apresentaram baixo reconhecimento.

O fato de o soro anti-peçonha reconhecer parcialmente a toxina Ts1-4 recombinante e o soro anti-Ts1 nativa não reconhecer causou uma preocupação quanto a qual composto da toxina recombinante estava sendo reconhecido pelo soro anti-peçonha, se a toxina Ts1-4 propriamente dita ou seus contaminantes bacterianos, uma vez que a peçonha, por sua grande complexidade, produz anticorpos contra uma infinidade de componentes. Então realizou-se um teste de reatividade das proteínas bacterianas insolúveis contra os soros produzidos, a fim de se avaliar se a peçonha estava reconhecendo a toxina recombinante ou as proteínas bacterianas. Vale ressaltar que os animais naturalmente já possuem anticorpos contra proteínas bacterianas e que o próprio Adjuvante de Freund apresenta em sua composição proteínas bacterianas.

Na placa sensibilizada com as proteínas bacterianas insolúveis, todos os soros produzidos apresentaram reatividade. Observa-se grande reatividade do soro anti-Ts1-4

recombinante e também do soro anti-peçonha, o soro anti-Ts1 nativa apresentou reatividade intermediária e o soro pré-imune baixa reatividade (Figura 39). Os resultados obtidos sugerem que o reconhecimento do soro anti-peçonha frente à toxina recombinante se deve-se principalmente a seus componentes bacterianos já que até o soro anti-Ts1 nativa, produzido contra um composto purificado, reconheceu parcialmente as proteínas bacterianas.

Placa proteínas bacterianas X Soros última dose

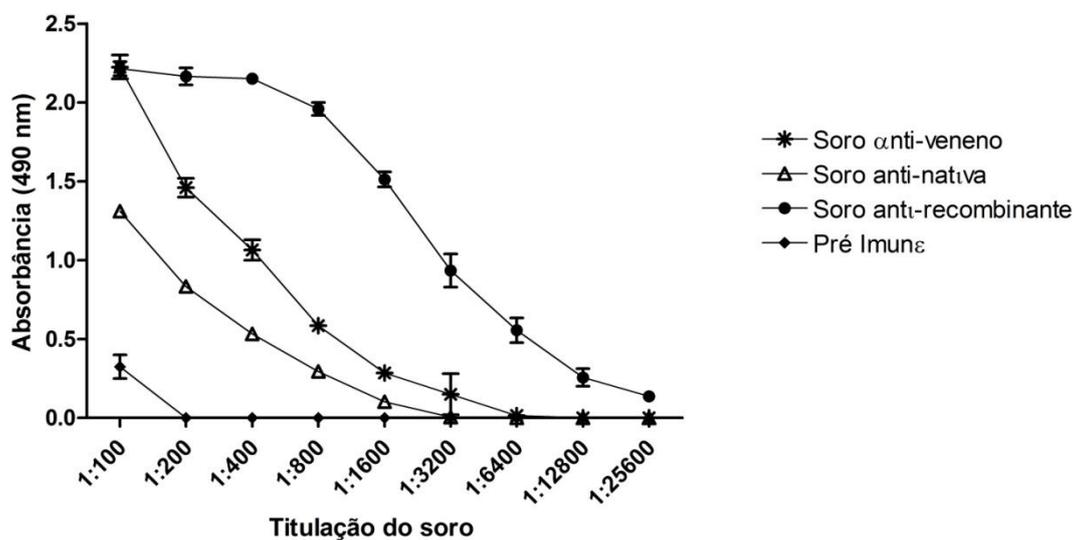


Figura 39: ELISA de reatividade Proteínas bacterianas X Soros diversos. . Placa sensibilizada com proteínas bacterianas. Soros utilizados da última dose (anti-peçonha e anti-Ts1 nativa: 4ª dose; anti-Ts1-4 recombinante: 5ª dose). Observa-se grande reatividade do soro anti-Ts1-4 recombinante e também do soro anti-peçonha, o soro anti-Ts1 nativa apresentou reatividade intermediária e o soro pré-imune baixa reatividade.

Assim, pode-se concluir dos testes de reatividade que o soro anti-peçonha é capaz de reconhecer todos os antígenos; o soro anti-Ts1 nativa reconhece parcialmente a peçonha, reconhece grandemente a toxina nativa e reconhece pouco a toxina recombinante; e que o soro anti-Ts1-4 recombinante é capaz de reconhecer grandemente a toxina recombinante, reconhecer parcialmente a peçonha bruta e reconhecer pouco a toxina nativa. Assim o soro anti-Ts1-4 é capaz de reconhecer apenas seu próprio antígeno, mas a toxina recombinante é reconhecida por todos os soros.

5.3.14 Western Blot

Em complementação aos testes de reatividade por ELISA foi realizada a reatividade dos soros através de western blot. Foram corridos cinco géis SDS-PAGE 12% com as amostras de proteínas bacterianas, toxina Ts1-4 recombinante, toxina Ts1 nativa e peçonha bruta. Um gel foi utilizado para coloração com Coomassie blue (Figura 40 A) e os outros quatro géis foram submetidos a transferência de suas amostras para uma membrana de PVDF na qual a reatividade de cada soro foi testada (Figura 40 B, C, D e E).

Na membrana tratada com soro anti-peçonha bruta (Figura 40 B) é possível visualizar o reconhecimento de bandas da peçonha bruta, a banda da Ts1 nativa e pouco reconhecimento de bandas das proteínas bacterianas, entretanto não houve reconhecimento da Ts1-4 recombinante. Esses dados contradizem os resultados do ELISA uma vez que nessa análise o soro anti-peçonha reconheceu todos os antígenos, inclusive a toxina Ts1-4 recombinante (Figura 38).

Na membrana tratada com soro anti-Ts1 nativa (Figura 40 C) é possível a visualização de reconhecimento com bandas de todas as amostras, inclusive da Ts1-4 recombinante. Esses dados confirmam todos os resultados do ELISA pois nessa análise o soro anti-Ts1 nativa reconhece todos os antígenos, embora o reconhecimento da toxina Ts1-4 recombinante tenha sido pequeno (Figura 38)

Na membrana tratada com soro anti-Ts1-4 recombinante (Figura 40 D) é possível visualizar o reconhecimento de proteínas bacterianas e da toxina Ts1-4 recombinante, não foram reconhecidas a toxina Ts1 nativa e a peçonha bruta. Esses corroboram os resultados obtidos no ELISA pois nessa análise o soro anti-Ts1-4 recombinante também só foi capaz de reconhecer a toxina Ts1-4 recombinante e as proteínas bacterianas (Figuras 38 e 39).

Na membrana tratada com soro contole pré-imune (Figura 40 E) só foi visualizado reconhecimento de bandas da proteína bacteriana. Este dado também foi obtido no ELISA (Figura 39).

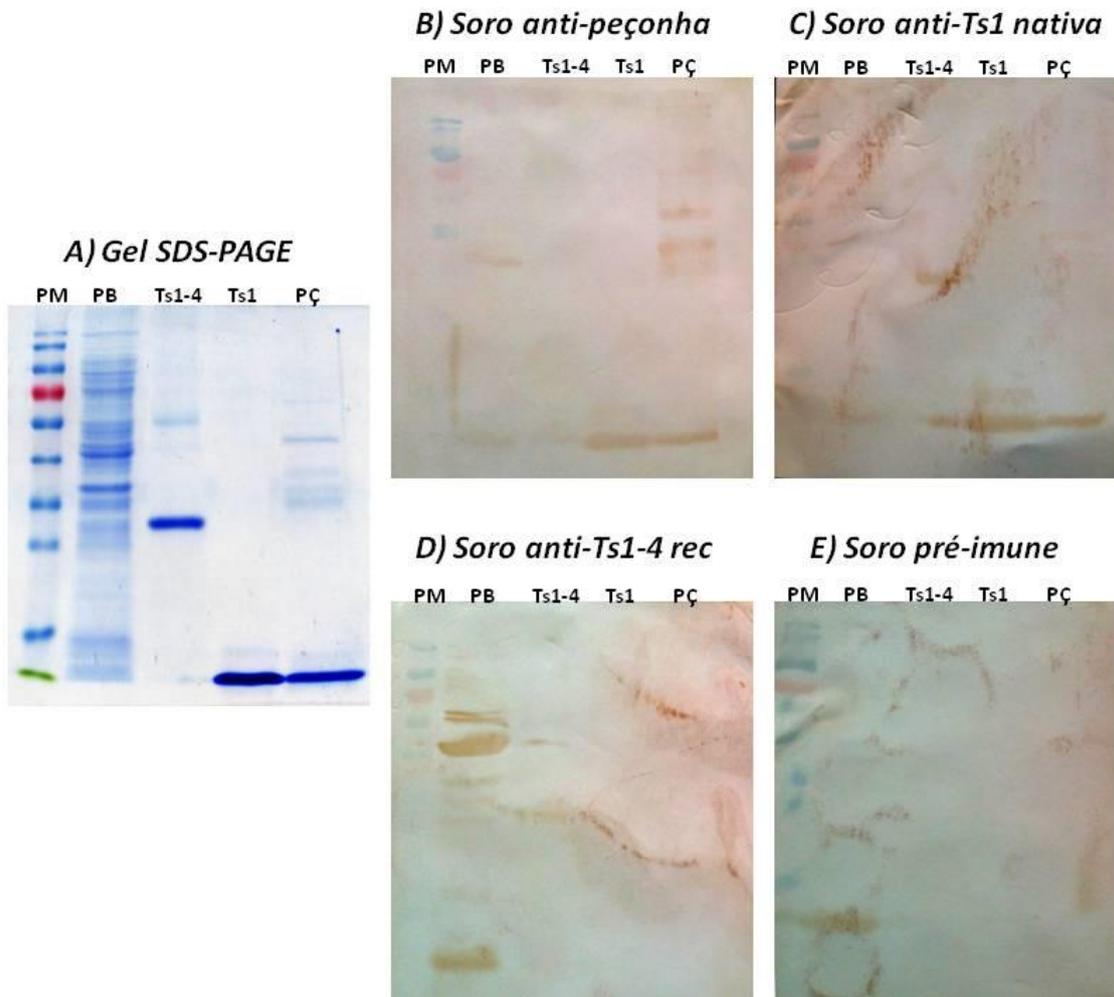


Figura 40: Western blot de reconhecimento dos soros frente aos antígenos. Em A, a resolução eletroforética das amostras PM (padrão de peso molecular), PB (proteínas bacterianas, Ts1-4 recombinante, Ts1 nativa e PÇ (peçonha bruta de *T. serrulatus*). Em B a membrana foi tratada com soro anti-peçonha e é possível a visualização do reconhecimento com bandas da peçonha bruta, a banda da Ts1 nativa e pouco reconhecimento de proteínas bacterianas, não houve reconhecimento da Ts1-4 recombinante. Em C a membrana foi tratada com soro anti-Ts1 nativa e é possível a visualização de reconhecimento com bandas de todas as amostras, inclusive da Ts1-4 recombinante. Em D a membrana foi tratada com soro anti-Ts1-4 recombinante e é possível visualizar o reconhecimento de proteínas bacterianas e da toxina Ts1-4 recombinante, não foram reconhecidas a toxina Ts1 nativa e a peçonha bruta. Em E a membrana foi tratada com soro controle pré-imune e só visualizado reconhecimento de bandas da proteína bacteriana.

5.3.15 Determinação da DL₅₀ da peçonha bruta de *Tityus serrulatus* e da toxina Ts1 nativa

A DL₅₀ foi calculada com o auxílio do programa StatPlus pelo método de Probitos. O programa StatPlus esta disponível para download em:
<http://www.analystsoft.com/en/products/statplus/download.phtml>

5.3.15.1 Determinação da DL₅₀ da peçonha bruta de *T. serrulatus*

A peçonha utilizada neste estudo estava congelada há poucos meses. As doses e mortes estão descritas na Tabela 10. A dose letal para 50% da população foi determinada em **17,6 µg** com erro padrão de 1,17 para camundongos de peso médio de 20 g (18-22 g). Foram utilizados em cada grupo seis animais.

Tabela 14: Determinação da DL₅₀ da peçonha bruta de *T. serrulatus*: doses e mortes

Grupos	Dose de peçonha Fator 1.3	Mortes após 24 horas	Total de animais por grupo
Controle -		0	6
1	8,58	0	6
2	11,15	0	6
3	14,5	5	6
4	18,85	6	6
5	24,51	6	6

5.3.15.2 Determinação da DL₅₀ da toxina Ts1 nativa de *T. serrulatus*

A toxina Ts1 utilizada neste estudo estava liofilizada. As doses e mortes estão descritas na Tabela 11. A dose letal para 50% da população foi determinada em **5,67 µg**

com erro padrão de 1,65 para camundongos de peso médio de 20 g (18-22 g). Foram utilizados em cada grupo cinco animais.

Tabela 15: Determinação da DL₅₀ da toxina Ts1 nativa de *T. serrulatus*: doses e mortes

Grupos	Dose de Ts1 nativa	Mortes após	Total de animais
	Fator 1.3	24 horas	por grupo
Controle -		0	5
1	2,37	0	5
2	3,08	0	5
3	4,01	1	5
4	5,21	2	5
5	6,78	4	5

5.3.16 Soroneutralização

Para avaliar o potencial de neutralização dos soros obtidos na imunização os mesmos foram incubados com 2 e 5 DL₅₀'s da peçonha bruta de *Tityus serrulatus* e da toxina Ts1 nativa.

Os resultados obtidos com a soroneutralização de 2 DL₅₀ da peçonha bruta e da toxina Ts1 nativa estão representados nas Tabelas 12 e 13 respectivamente e na Figura 41.

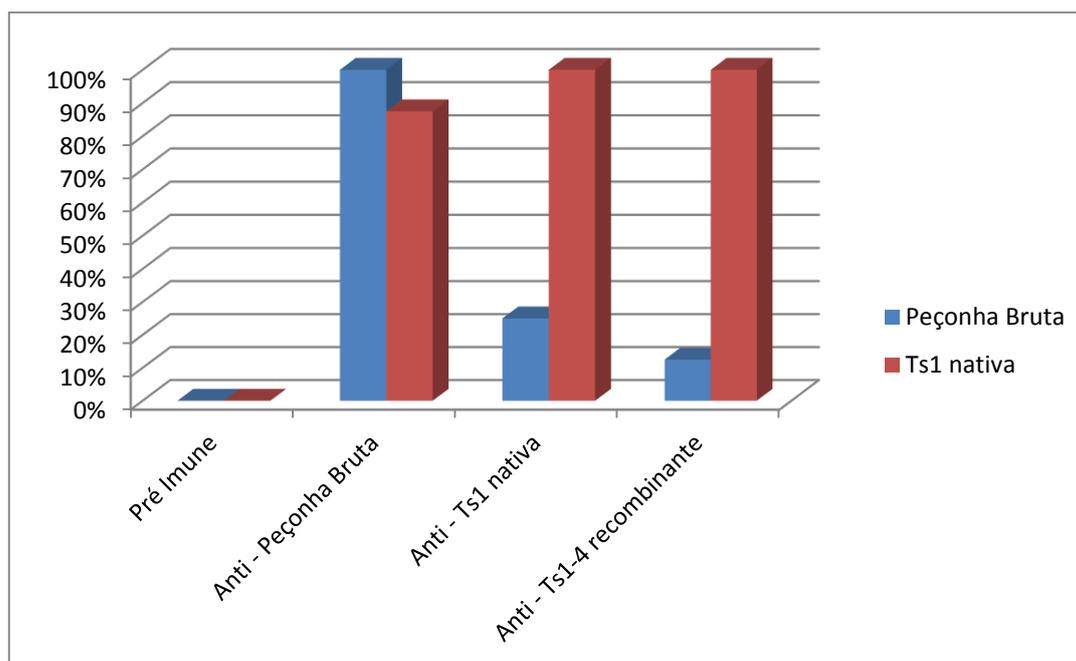


Figura 41: Gráfico da soroneutralização dos diversos soros contra 2 DL₅₀ da peçonha bruta de *T. serrulatus* e da toxina Ts1 nativa. O soro pré-imune não neutraliza os efeitos letais da peçonha bruta ou da toxina Ts1 nativa. O soro anti-peçonha bruta é capaz de neutralizar 100% da peçonha e 87,5 % da Ts1 nativa. O soro anti-Ts1 nativa é capaz de neutralizar 25% da peçonha bruta e 100% da Ts1 nativa. O soro anti-Ts1-4 recombinante é capaz de neutralizar apenas 12,5 % da peçonha bruta e 100% da toxina Ts1 nativa.

Os resultados obtidos com a soroneutralização de 2 DL₅₀ da peçonha bruta de *T. serrulatus* mostram que, como o esperado, o soro controle pré-imune não neutraliza os efeitos letais da peçonha bruta. O soro anti-peçonha neutraliza eficientemente 100% da peçonha, o soro anti Ts1-nativa neutraliza 25% e o soro anti-Ts1-4 recombinante neutraliza apenas 12,5 % de 2 DL₅₀ da peçonha (Tabela 12).

Tabela 16: Soroneutralização da Peçonha bruta de *T. serrulatus*

SORO	Mortes após 24 horas	Total de animais por grupo	Potencial de neutralização
Pré Imune	6	6	0%
Anti – Peçonha bruta	0	8	100%
Anti - Ts1 nativa	6	8	25%
Anti - Ts1-4 recombinante	7	8	12,50%

Quando esses dados são correlacionados com os obtidos no ELISA (Figura 36) e Western blot (Figura 40), vê-se que era esperada a alta neutralização da peçonha com o soro anti-peçonha, visto a alta reatividade do soro com o antígeno nessas análises. No que se refere ao soro anti-Ts1 nativa, era esperada uma neutralização intermediária da peçonha, uma vez que no ELISA (Figura 36) e Western blot (Figura 40) a reatividade foi mediana, contudo observou-se uma neutralização de 25 % da peçonha, entretanto, tendo em vista que a toxina Ts1 representa 15% da peçonha bruta a neutralização obtida foi considerada eficiente. O soro anti-Ts1-4 recombinante apesar de não mostrar nenhuma reatividade no ELISA (Figura 36) ou Western blot (Figura 40), foi capaz de neutralizar 12,5% da peçonha, metade da neutralização alcançada pelo soro anti-Ts1 nativa.

Os resultados obtidos com a soroneutralização de 2 DL₅₀ da toxina Ts1 nativa de *T. serrulatus* mostram que, também como o esperado, o soro controle pré-imune não neutraliza os efeitos letais da toxina Ts1 nativa. O soro anti-peçonha neutraliza 87,5% da peçonha, o soro anti Ts1-nativa e o soro anti-Ts1-4 recombinante neutralizam eficientemente 100% 2 DL₅₀ da toxina nativa (Tabela 13)

Tabela 17: Soroneutralização da toxina Ts1 nativa de *T. serrulatus*

SORO	Mortes após 24 horas	Total de animais por grupo	Potencial de neutralização
Pré Imune	6	6	0%
Anti – Peçonha bruta	1	8	87,50%
Anti - Ts1 nativa	0	8	100%
Anti - Ts1-4 recombinante	0	8	100%

Quando esses dados são correlacionados com os obtidos no ELISA (Figura 37) e Western blot (Figura 40), vê-se que era esperada a alta neutralização da toxina Ts1 com o soro anti-peçonha e com o soro anti-Ts1 nativa, visto a alta reatividade de ambos os soros com a Ts1 nessas análises. Contudo a capacidade de neutralização do soro anti-Ts1-4 recombinante de 100% foi uma grande surpresa, uma vez que não foi observada nenhuma reatividade deste soro com a toxina nativa no ELISA ou no Western blot. Os testes de ELISA e Soroneutralização foram repetidos por 3 vezes e o resultado foi o mesmo em todas as repetições.

Quando foi testado o potencial de neutralização dos soros com 5 DL₅₀ da peçonha ou da toxina Ts1 nativa, foi visto que nenhum dos soros foi capaz de proteger essa dose de antígeno, todos os animais de todos os grupos morreram no intervalo de 4 horas.

6 Discussão

Os acidentes por animais peçonhentos foram recentemente reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doenças não atendidas ou negligenciadas, que afetam milhões de pessoas pobres, sendo uma manifestação evidente das desigualdades prevalentes em saúde.

O acidente escorpiônico é o de maior número de notificações no Brasil, seguido por acidentes com serpentes e aranhas. Em 2010 foram notificados 50.126 acidentes escorpiônicos, 29.635 acidentes ofídicos e 24.279 acidentes causados por aranhas. O número de óbitos registrados para esses acidentes foi de 88, 146 e 17 óbitos respectivamente. Os acidentes por serpentes, embora com menor ocorrência, são mais letais que os acidentes escorpiônicos. O escorpião *Tityus serrulatus* é o principal causador de acidentes graves no Brasil, principalmente no estado de Minas Gerais (Ministério da Saúde Brasil, 2012).

O tratamento do acidente escorpiônico visa neutralizar o mais rápido possível a toxina circulante, combater os sintomas do envenenamento e dar suporte às condições vitais do paciente, e é realizado por administração intravenosa de soro antiescorpiônico, nos casos graves e moderados, ou administração de analgésicos nos casos leves. Os problemas enfrentados na atual preparação do soro refletem a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para esse fim. O soro antiescorpiônico é atualmente produzido em rebanhos equinos com utilização da peçonha bruta, que é composta por uma mistura complexa de componentes tóxicos e não tóxicos, assim o soro é produzido contra todos os componentes da peçonha. Entretanto, as neurotoxinas são as grandes responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos do envenenamento e um soro produzido especificamente contra elas seria muito mais eficaz.

Dessa forma surge a necessidade do desenvolvimento de terapias mais efetivas contra o envenenamento, como a produção de um soro contra as toxinas escorpiônicas mais tóxicas para mamíferos. Isso se torna uma maneira mais efetiva e direcionada no combate dos componentes tóxicos do veneno, uma vez que os anticorpos produzidos serão específicos às toxinas, levando à administração de um soro de melhor qualidade e em menor quantidade nas vítimas.

Nosso grupo propõe o uso de toxinas recombinantes para o desenvolvimento de antipeçonhas mais específicas. Neste contexto o presente estudo buscou avaliar a imunogenicidade da toxina Ts1 do escorpião amarelo *T. serrulatus*, em sua forma nativa e recombinante com quatro cópias em tandem, em complementação a caracterização imunológica da toxina recombinante Ts1 com uma e duas cópias em tandem (Ts1-1 e Ts1-2) realizada por Mendes (2007). O primeiro passo deste trabalho foi então a purificação da toxina Ts1 a partir da peçonha bruta de *T. serrulatus*, a mais abundante toxina da peçonha.

Os primeiros trabalhos para purificação desta peçonha foram realizados por Diniz e Gonçalves (1956, 1960), utilizando eletroforese em papel e gel de amido. Posteriormente Gomez e Diniz (1966) obtiveram duas frações tóxicas a partir da peçonha bruta, utilizando extração da peçonha com água, filtração em gel de Sephadex G-25, seguida de cromatografia em CM-celulose.

Um método mais eficiente e rápido para o isolamento de toxinas da peçonha de *T. serrulatus* foi desenvolvido por Arantes *et al.* (1989), através da cromatografia em CM-celulose-52, utilizando tampão bicarbonato de amônio, pH 7,8, onde se obtém treze frações, das quais a fração XIII foi considerada pura e igual a TsTx- γ (Possani *et al.*, 1977), atualmente denominada TsTx-I ou Ts1 (Cologna *et al.*, 2009).

Como o objetivo era a purificação da toxina Ts1 em grande quantidade, foi utilizado o método proposto por Arantes *et al.* (1989), no qual, com apenas uma etapa cromatográfica se obtém a toxina Ts1 pura. Para isso foram utilizadas 500 mg de peçonha, e esse extrato, após cromatografia em CM-celulose-52 pH 7,8, resultou em quatorze frações (Figura 16). No geral o perfil obtido se assemelhou muito ao obtido por Arantes *et al.* (1989), mas algumas diferenças sutis foram percebidas entre os cromatogramas. A primeira delas é a diferença nos gradientes obtidos, Arantes *et al.* (1989) descreve um gradiente convexo de concentração de 0,01 M a 1 M de bicarbonato de amônio, mas o obtido neste trabalho foi de 0,01 M a 0,6 M. Talvez essa curva mais suave do gradiente tenha proporcionado a maior separação das frações XI e XII de Arantes *et al.* (1989), nas frações X, XI, XII e XIII no presente trabalho. Outra diferença está na perda de duas frações do cromatograma (originalmente denominadas por Arantes *et al.* (1989) de V e VI), essa perda ocorreu durante a lavagem com tampão 0,01 M, proveniente de um

rompimento da conexão da coluna devido ao aumento de pressão no sistema, e está representada por uma descontinuidade da linha de base no cromatograma.

A toxina Ts1 foi eluída na fração XIV, correspondente a fração XIII de Arantes *et al.* (1989), e caracterizada por eletroforese em gel SDS-PAGE e espectrometria de massas. A resolução eletroforética e o espectro de massa confirmaram a pureza da toxina e sua identidade, visto que a massa molecular obtida por espectrometria de massa foi de aproximadamente 6880,93 Da e a massa descrita para essa toxina é de 6890,9 Da (Cologna *et al.* 2009), e não houveram compostos significativamente contaminantes.

Para obtenção da toxina Ts1 recombinante com quatro cópias em tandem (Ts1-4), um longo caminho foi percorrido. A lógica em se expressar várias cópias unidas da mesma toxina é devido a seu pequeno tamanho (7 kDa). É conhecido que proteínas pequenas expressas no citoplasma de bactérias tendem a ser instáveis principalmente por causa da sua rápida degradação por enzimas proteolíticas da bactéria hospedeira (Rabbani *et al.*, 1988; Parsell *et al.*, 1989). Para evitar esse problema, os peptídeos e proteínas pequenas têm sido frequentemente produzidos como proteínas de fusão. Entretanto, a principal desvantagem desta técnica para a produção em larga escala é que o produto desejado constitui somente uma pequena porção das proteínas de fusão, uma vez que nos sistemas comerciais disponíveis as proteínas utilizadas como carreadoras são muito grandes com 30-50 kDa (Ishikawa & Tamaoki, 1996). Por isso, a fusão de várias cópias de uma mesma proteína vem sendo usada para suplantar este problema. Este método traz mais estabilidade para a proteína a ser expressa, sem precisar de uma proteína carreadora; e vem obtendo muitos resultados positivos com a expressão da calcitonina (Gigova *et al.*, 1989; Ishikawa & Tamaoki, 1996).

Mendes (2007) descreve a diferença na expressão das duas formas recombinantes da toxina Ts1 de *T. serrulatus*. A Ts1-2 foi expressa em quantidades maiores (30 mg/L) que a Ts1 -1 (20 mg/L), cerca de 30% a mais. Isto pode ser devido ao aumento do tamanho da proteína expressa que levou a uma maior estabilidade. Para o gene da calcitonina, uma proteína de 32 aminoácidos (a metade de aminoácidos da TsTx-I), foi demonstrado que a expressão de genes multiméricos (em tandem), estabiliza a proteína e conseqüentemente gera uma quantidade maior de proteína expressa (Gigova *et al.*, 1989; Ishikawa & Tamaoki, 1996).

A construção dessa toxina em vetor pGEM-T Easy estava pronta no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (ICB/UFMG) e foi realizada por Mendes (2007), contudo havia um códon de parada prematuro localizado antes do início da toxina, em uma longa sequência que se estendia entre os sítios de restrição das enzimas BamHI e HindIII, e que precisava ser removido (Figura 19).

Para remoção do códon de parada prematuro presente no clone da Ts1-4 em pGEM-T Easy foi desenvolvida uma PCR que com iniciadores que se anelavam à sequência da toxina Ts1-4 e adicionavam, ao lado do sítio de HindIII das extremidades, o sítio da enzima BamHI. Dessa forma o códon de parada prematuro foi removido da construção. A PCR foi padronizada com utilização de 2 pmol de iniciadores e temperatura de anelamento de 60 – 56 °C.

O produto de PCR Ts1-4 com extremidades BamHI, foi então novamente ligado ao vetor pGEM-T Easy para sua propagação. O vetor propagado foi novamente digerido com enzima de restrição BamHI e o inserto liberado foi ligado ao vetor pET 11a onde foi expresso.

O sistema de expressão escolhido foi o bacteriano, por ser barato, simples e ter muitas ferramentas disponíveis (Villaverde & Currió, 2003). O vetor escolhido foi o pET 11a por já possuirmos no laboratório e por apresentar bons resultados em expressão anterior de toxinas feita pelo nosso grupo (Araújo, 2003) e pelo fato de 90% das publicações sobre proteínas recombinantes, usarem o vetor pET (Sorensen & Mortensen, 2005). A linhagem BL21(DE3) foi selecionada por possuir deficiência de dois genes de proteases citoplasmáticas e por ter se mostrado eficiente em expressões de diversas proteínas (Cho *et al.*, 2007; Medynski *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Warner *et al.*, 2007). A linhagem Origami 2 (DE3) foi escolhida por apresentar duas mutações em redutases (*Tioredoxina e Glutathione reductase*) que conferem ao seu citoplasma ambiente oxidativo, necessário para a formação de pontes dissulfeto. Este fato aumenta as chances da formação de pontes dissulfeto e propicia as proteínas recombinantes apresentarem conformação tridimensional próxima a das nativas.

A proteína recombinante Ts1-4 foi expressa, apenas na linhagem bacteriana BL21, como corpos de inclusão. Existem diversos trabalhos descrevendo este tipo de expressão tanto com o vetor pET 11a como para outros tipos de pET (Turkov *et al.*, 1997; Roberto

et al., 2004; Zhao *et al.*, 2007; Kou *et al.*, 2007). Os corpos de inclusão ocorrem por deposição de polipeptídeos com enovelamento errados ou parciais, que expõe regiões hidrofóbicas e permite interações intermoleculares (Villaverde & Carrió, 2003).

Dois tipos de estratégias podem ser usados para tentar obter a proteína recombinante solúvel: modificações das condições durante a expressão e reenovelamento dos corpos de inclusão (Sorensen & Mortensen, 2005).

Mendes (2007), quando expressou a toxina recombinante Ts1 com uma e duas cópias em tandem, obteve o mesmo resultado – a expressão de proteínas em corpos de inclusão. Para tentar produzir uma proteína solúvel, Mendes (2007) testou várias modificações nas condições da expressão como: redução da temperatura, redução da taxa de expressão do gene recombinante, expressão em meios mais ricos, modificações nos níveis de oxigênio e fonte de carbono, linhagens bacterianas diferentes, baixos níveis de indução, dentre outros (Moore *et al.*, 1993; Weickert *et al.*, 1996; Villaverde & Carrió, 2003; Sorensen & Mortensen, 2005), contudo nenhuma dessas estratégias foi capaz de induzir a produção de proteínas solúveis.

No presente trabalho foram testadas as condições de variação na temperatura, com expressão a 25 °C e 37 °C; redução da taxa de expressão, com expressão com e sem indução por IPTG; e utilização de diferentes linhagens bacterianas, BL21 e Origami. Em nenhuma das estratégias utilizadas foi possível a formação de proteínas solúveis.

Desse modo, tentou-se obter uma proteína solúvel a partir dos corpos de inclusão. Várias tentativas de solubilização da toxina Ts1 recombinante com uma e duas cópias em tandem foram realizadas por Mendes (2007), dentre elas a solubilização com 6M Uréia, SDS 10%, 6M Tiocianato de Guanidina, Triton X-100 25%, Tween-20 25%, 4M NaOH, 3M de Acetato de sódio pH 5,2 e 1M de Tris HCl pH 4,0. Em nenhuma das tentativas se obteve sucesso na solubilização. Então neste trabalho foi testada a solubilização da Ts1-4 recombinante com dimetilsulfóxido (DMSO), um forte solvente aprótico e polar, mas nem mesmo o DMSO promoveu a solubilização da Ts1-4, após resolução eletroforética toda proteína recombinante estava na fração insolúvel, assim como as proteínas bacterianas. Dessa forma não havia como purificar de forma mais efetiva a toxina recombinante das proteínas bacterianas.

Em muitos trabalhos, a proteína recombinante solúvel e muitas vezes funcional só foi obtida após um processo de re-novelamento *in vitro* (Afzal *et al.*, 2007; Medynski *et al.*, 2007; Warner *et al.*, 2007). Porém, a otimização deste processo para uma dada espécie de proteína envolve empenho muito grande com resultados irregulares que nem sempre conduzem para processos úteis para o fluxo conveniente de produção de grandes quantidades de proteína recombinante (Villaverde & Carrió, 2003). Além de ser um processo de alto custo (Sorensen e Mortensen, 2005).

Harlow e Lane (1988) mostraram que os corpos de inclusão podem ser utilizados para a produção de anticorpos e posteriormente, Vuillard e Freeman (<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.nwfsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>) confirmaram este resultado. Nosso grupo também já obteve sucesso em imunização com corpos de inclusão (Mendes *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Lobato *et al.*, 2010). Como a produção de proteínas recombinantes neste trabalho tem essa finalidade, decidiu-se utilizar os corpos de inclusão para as imunizações.

Os corpos de inclusão podem conter de 50 a 96% da proteína recombinante de interesse. Eles podem conter proteínas de membrana e debris celulares que precipitam juntamente com os corpos de inclusão, mas também tem outras proteínas que são parte integral dos agregados (Villaverde & Carrió, 2003).

No nosso caso, não havia muitas proteínas contaminantes junto com a proteína de interesse, logo foram utilizados para os ensaios de imunização em coelhos os corpos de inclusão com a toxina Ts1-4 recombinante, a toxina Ts1 nativa obtida pelo fracionamento da peçonha bruta e a própria peçonha bruta de *T. serrulatus*.

Após o ciclo de imunização dos coelhos, o sangue foi coletado e o soro titulado por ELISA, contra seu próprio antígeno. Os coelhos imunizados com peçonha bruta e Ts1 nativa alcançaram título adequado com três doses de 100 µg de imunógeno, mas os coelhos imunizados com a toxina Ts1-4 recombinante só alcançaram título adequado com aplicação de uma 5ª dose com 400 µg de imunógeno.

Quando a reatividade dos soros foi testada contra os diferentes antígenos, observou-se que os soros anti-peçonha bruta e anti-Ts1 nativa reconheciam os três antígenos – peçonha bruta, Ts1 nativa e Ts1-4 recombinante, mas que o soro anti-Ts1-4 recombinante só foi capaz de reconhecer a toxina Ts1-4 recombinante. Entretanto quando

foi avaliada a capacidade de neutralização dos soros, o soro anti-Ts1-4 recombinante foi capaz de neutralizar 100% de 2 DL₅₀ da toxina nativa e 12,5% de 2 DL₅₀ da peçonha bruta.

Outros trabalhos também demonstraram que apesar do título dos soros obtidos estar baixo frente a peçonha ou toxina usada para o desafio; os soros foram capazes de neutralizar seus efeitos tóxicos (Calderon-Aranda *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2003). Mendes *et al.* (2008) mostrou que apesar do baixo título dos soros dos coelhos imunizados com a toxina recombinante Ts1-1 e Ts1-2 eles foram capazes de proteger *in vivo*, animais desafiados com 1 e 2 DL₅₀ da peçonha de *Tityus serrulatus*. A proteção observada em camundondos poderia ser alcançada por anticorpos neutralizantes, mesmo que de baixa afinidade, que reconhecem diretamente o sítio farmacológico ativo da toxina, ou pelo impedimento de interação produzido quando dois ou mais anticorpos não neutralizantes se ligam à molécula da toxina, mesmo em um local não-farmacológico, tornando impossível para a toxina interagir com o seu alvo (Garcia *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a toxina Ts1-4 recombinante tem capacidade de gerar anticorpos que neutralizam as ações da toxina Ts1 nativa e, em menor quantidade, da peçonha bruta de *Tityus serrulatus*.

Como foi sugerido pela alta reatividade no ELISA, o soro anti-peçonha bruta foi capaz de neutralizar 100% de 2 DL₅₀ da peçonha e 87,5% de 2 DL₅₀ da toxina Ts1 nativa. E o soro anti-Ts1 nativa foi capaz de proteger 100% de 2 DL₅₀ da toxina nativa e 25% de 2 DL₅₀ da peçonha bruta.

Alguns pontos devem ser ponderados. A toxina Ts1 é apenas um componente da peçonha, sendo assim anticorpos feitos utilizando ela como imunógeno podem não ser capazes de um reconhecimento total da peçonha. Outro ponto relevante é que a proteína recombinante utilizada para as imunizações não está completamente pura, sendo assim, anticorpos contra as proteínas bacterianas contaminantes também vão ser produzidos. Portanto, o soro vai ter uma proporção menor de anticorpos contra a proteína recombinante, do que teria se ela estivesse pura, levando a um menor reconhecimento da peçonha de *T. serrulatus* pelos anticorpos anti-toxinas recombinantes do que o esperado. Para solucionar este problema pode-se tentar a purificação do soro em coluna de afinidade com a toxina nativa.

Os resultados obtidos pela neutralização com o soro anti-Ts1 nativa foram cruciais para o entendimento da caracterização imunológica dessa toxina em suas 3 formas recombinantes (Ts1-1, Ts1-2 e Ts1-4). Foi observado neste trabalho que a o soro anti-Ts1 nativa é capaz de neutralizar 25% de 2 DL₅₀ da peçonha. Os resultados do trabalho com as formas recombinantes de Mendes (2007), mostram que o soro produzido contra a toxina Ts1-1 recombinante foi capaz de neutralizar 50% de 2 DL₅₀ da peçonha e que o soro produzido contra a toxina Ts1-2 recombinante foi capaz de neutralizar 75% de 2 DL₅₀ da peçonha. Os resultados do presente trabalho mostram que o soro produzido contra a toxina recombinante Ts1-4 foi capaz de neutralizar apenas 12,5% de 2 DL₅₀ da peçonha.

Esses dados sugerem então que as formas recombinantes da toxina Ts1-1 e Ts1-2 foram mais efetivas na neutralização dos efeitos tóxicos da peçonha do que a própria toxina nativa. Entretanto, sem testes em paralelo, vários pontos invalidam essa conclusão e devem ser ponderados.

Primeiramente deve-se comparar a qualidade dos soros obtidos no trabalho de Mendes (2007) e no presente trabalho. Comparando os soros anti-peçonha obtidos tem-se que o soro obtido por Mendes (2007) foi capaz de neutralizar 5 DL₅₀ da peçonha bruta já o soro obtido neste trabalho não foi capaz de alcançar tal proteção. Analisando os resultados dos soros anti-toxinas recombinantes temos que o soro anti-Ts1-2 recombinante obtido por Mendes (2007, 2008) foi capaz de proteger eficientemente 14 DL₅₀ da toxina Ts1 nativa já o soro anti-Ts1-4 obtido no presente trabalho não foi capaz de neutralizar 5 DL₅₀ da toxina Ts1 nativa. Logo pode-se concluir que, no geral, os soros obtidos por Mendes (2007) apresentam melhor qualidade, maior especificidade a peçonha bruta de *T. serrulatus* e a toxina Ts1 nativa, que os soros obtidos no presente trabalho. A diferença na qualidade dos soros pode estar relacionada a diferenças nos processos de imunização nos dois trabalhos.

Mendes (2007) utilizou para imunização com peçonha bruta ao todo 9 doses de imunógeno, as 3 primeiras doses de 100 µg e as 6 próximas doses com 150 µg, em um intervalo de 15 dias entre as doses. O título adequado do soro só foi alcançado após a 6ª dose, mesmo assim mais 3 doses extras de reforço ainda foram aplicadas. Foram utilizados para essa imunização hidróxido de alumínio nas 6 primeiras doses e adjuvante incompleto de Freund's nas 3 últimas doses. No presente trabalho foram necessárias

apenas 3 doses de 100 µg de peçonha bruta para o alcance do título adequado do soro e mais uma dose de reforço foi aplicada. As doses foram aplicadas em intervalos de 10 dias com adjuvante de Freund's completo na primeira dose e incompleto nas 3 próximas doses. As diferenças na resposta imunológica das imunizações com peçonha bruta podem estar associadas a diferenças nos animais utilizados e até mesmo diferenças na peçonha utilizada, Mendes (2007) utilizou peçonha estocada no laboratório e o presente trabalho utilizou peçonha recém extraída para imunização. Sabe-se que a composição da peçonha pode ser alterada devido a sua estocagem a longo prazo.

No processo de imunização com as toxinas recombinantes Mendes (2007) utilizou 7 doses de imunógeno (3 doses de 100 µg e 4 doses de 150 µg) em adjuvante de Freund's, com intervalo de 15 dias. No presente trabalho foram utilizadas 5 doses de imunógeno, em adjuvante de Freund's, sendo as 4 primeiras com 100 µg e a última com 400 µg, o intervalo entre as doses foi de 10 dias. Nos dois trabalhos o soro obtido foi utilizado para soroneutralização sem alcance do título adequado. Contudo, como as imunizações em Mendes (2007) foram mais espaçadas, com quantidade fixa de antígeno e com mais doses, acredita-se que a especificidade do soro a toxina Ts1 tenha sido maior que a do soro obtido neste trabalho.

Para se afirmar que o soro produzido contra as toxinas recombinante é realmente mais efetivo na neutralização da peçonha bruta que o soro contra a toxina nativa é necessária a repetição dos experimentos de imunização e soroneutralização com os mesmos parâmetros, para que incógnitas como diferença de tempo entre os trabalhos, forma de imunização, composição da peçonha e diferenças na resposta dos animais não sejam tão evidentes.

Como perspectivas para este trabalho estão a repetição dos experimentos de imunização e soroneutralização, a determinação da estrutura tridimensional alcançada pelas toxinas recombinantes, tentativa de remodelagem dessas toxinas, troca de vetores, linhagens e sistemas de expressão para se obter toxinas recombinantes com conformação mais próxima da nativa e descoberta de novos potenciais imunógenos na peçonha bruta de *T.serrulatus* que podem ser utilizados na produção de um soro mais específico e eficiente contra o envenenamento causado por esta espécie.

7 Conclusão

- A toxina Ts1 nativa foi purificada com êxito a partir da peçonha bruta do escorpião *T. serrulatus* e bem caracterizada por eletroforese em gel SDS-PAGE e espectrometria de massa;

- A construção da toxina recombinante Ts1-4 foi expressa com sucesso em sistema pET;

A proteína recombinante foi expressa de maneira insolúvel em corpos de inclusão, mas elas podem ser usadas desta maneira para produzir anticorpos;

- A toxina Ts1 nativa produziu anticorpos neutralizantes capazes de proteger *in vivo* 25% dos animais desafiados com 2 DL₅₀ da peçonha bruta de *T. serrulatus*

- A proteína recombinante produziu anticorpos neutralizantes que protegeram *in vivo* 100% dos animais desafiados com 2 DL₅₀ da toxina nativa e 12,5% dos animais desafiados com 2 DL₅₀ da peçonha bruta de *T. serrulatus*;

- O avanço mais importante obtido a partir deste trabalho foram as informações acerca da capacidade de produção de anticorpos neutralizantes da toxina Ts1 nativa, que ainda não tinha sido estudada neste contexto;

- Os resultados promissores descritos neste trabalho reforçam a importância da geração de novos imunógenos para produção de soro anti-escorpiônico.

8 Perspectivas

Como perspectivas para este trabalho estão a repetição dos experimentos de imunização e soroneutralização com a toxina Ts1 nativa e suas formas recombinantes (Ts1-1, Ts1-2 e Ts1-4);

- Purificação dos soros obtidos em coluna de afinidade e avaliação de seu potencial de neutralização
- Determinação da estrutura tridimensional alcançada pelas toxinas recombinantes por métodos como cristalografia de raio X;
- Tentativa de remodelagem das toxinas recombinantes, de forma que se aproximem da conformação tridimensional da toxina nativa;
- Busca de novos potenciais imunógenos na peçonha bruta de *T.serrulatus* que podem ser utilizados na produção de um soro mais específico e eficiente contra o envenenamento causado por esta espécie.

Referências Bibliográficas

- AFZAL, A. J. e LIGHTFOOT, D. A. Soybean disease resistance protein RHG1-LRR domain expressed, purified and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies: preparation for a functional analysis. *Protein Expr Purif*, v.53(2), p.346-55. **2007**
- ALMEIDA, F.M.; PIMENTA, A.M.; DE FIGUEIREDO, S.G.; SANTORO, M.M.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; DINIZ, C.R.; DE LIMA, M.E. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*, v. 40(7), p.1041-1045. **2002**
- ALTSCHUL, S. F. e LIPMAN, D. J. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87(14), p.5509-13. **1990**
- ALVARENGA, L.M.; MACHADO DE AVILA, R.A.; AMIM, P.R.; MARTINS, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.G.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v. 46(6), p. 664-671. **2005**
- ALVARENGA, L.M.; MARTINS, M.S.; MOURA, J.F.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J.C.; MANGILI, O.C.; GRANIER, C.; CHAVÉZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon*, v. 42, p. 725–731. **2003**
- AMARAL, C.F.S. & REZENDE, N.A. Acidentes por escorpiões. *Arq. Bras. Med.*, v. 64, p. 212-216. **1990**
- AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; FREIRE-MAIA, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am.J. Cardiol.*, v. 71, p. 242-245. **1993**
- ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial

- characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. *Toxicon*, v. 8, p. 907-16. **1989**
- ARANTES, E.C.; RICCIOPPO-NETO, F.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1199, p. 69-75. **1994**
- ARAUJO, S.C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L.M.; MANGILI, O.C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon*, v. 41(3), p. 261-7. **2003**
- BARHANING, J.; GIGLIO, J.R.; LÉOPOLD, P.; SCHMID, A.; SAMPAIO, S.V.; LAZDUNSKI, M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *Tityus* gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, v. 257(21), p. 12553-12558. **1982**
- BARHANING, J.; IDELFONSE, M.; ROUGIER, O.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LAZDUNSKI, M. *Tityus* gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. *Plugers Archs.*, v. 400(1), p. 22-27. **1984**
- BARHANING, J.; PAURON, D.; LOMBET, A.; NORMAN, R.I.; VIJVERBERG, H.P.M.; GIGLIO, J.R.; LAZDUNSKI, M. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus* gamma toxin receptor associated with the gating component of the Na⁺ channel from rat brain. *EMBO J.*, v. 2(6), p. 915-920. **1983**
- BARRAVIERA, B. Venenos – aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro, EPUB, p. 411. **1999**
- BATISTA, C.V.F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C.; HAJDU, P.; PANYI, G.; GASPAR, R.; POSSANI, L.D. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and *Shaker* BK⁺-channels with distinctly different affinities. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1601(2), p. 123-131. **2002**

- BAUERFEIND, R.; DAVID, C.; GALLI, T.; MCPHERSON, P.S.; TAKEI, K.; DE CAMILLI, P. Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, v. 60, p. 397-404. **1995**
- BEAR, F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A; Exploring the brain. Ed. Willians and Wilkins. **1996**
- BEETON, C.; PENNINGTON, M.W.; WULFF, H.; SINGH, S.; NUGENT, D.; CROSSLEY, G. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol.*, v. 67, p. 1369–1381. **2005**
- BEETON, C.; WULFF, H.; BARBARIA, J.; CLOT-FAYBESSE, O.; PENNINGTON, M.; BERNARD, D.; CAHALAN, M.; CHANDY, K.; BERAUD, E. Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 13942-13947. **2001**
- BEETON, C.; WULFF, H.; SINGH, S.; BOTSKO, S.; CROSSLEY, G.; GUTMAN, G.A.; CAHALAN, M.D.; PENNINGTON, M.W.; CHANDY, K.G. A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. *J Biol Chem.*, v. 278, p. 9928-9937. **2003**
- BEETON, C.; WULFF, H.; STANDIFER, N.E.; AZAM, P.; PENNINGTON, M.W. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 103 (46), p. 17414-17419. **2006**
- BERTAZZI, D.T. Isolamento e caracterização bioquímica de componentes do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. **2007**
- BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; AZZOLINI, A.E.C.S.; TALHAFERRO, V.L.; LAZZARINI, M.; ARANTES, E.C. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*, v. 41, p. 501–508. **2003**

- BLANC, E.; LECOMTE, C.; RIETSCHOTEN, J.V.; SABATIER, J.M.; DARBON, H.
Solution structure of TsKapa, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proteins*, v. 29(3), p. 359-369. **1997**
- BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, p. 31-39. **1993**
- BOMFIM, J.H.; DE GODOY, M.A.; GIGLIO, J.R.; DE OLIVEIRA, A.M.; ARANTES, E.C. Effects induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxins TsTX-I and TsTX-V on the rat isolated retractor penis muscle. *Pharmacology*, v. 73(4), p. 190-198. **2005**
- BORGES, A.; BERMINGHAM, E.; HERRERA, N.; ALFONZO, M. J.; SANJUR, O. I. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): the historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. *Toxicon*, v. 55(2-3), p. 436-54. **2010**
- BORGES, A; SOUZA, L.; ESPINOZA, J.; SANTOS RG.; KALAPOTHAKIS, E.; VALADARES, D.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. "Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian Antivenoms. *Toxicon*, v. 51, p. 66-79. **2008**
- BORTOLUZZI, L.R.; QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotrop.*, v. 7 (3), p. 357-359. **2007**
- BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*, v. 49, p. 142-158. **2007**
- BOUDIER, J.L.; JOVER, E.; CAU, P. Autoradiographic localization of voltage-dependent sodium channels on the mouse neuromuscular junction using ¹²⁵I-alpha scorpion toxin. I. Preferential labeling of glial cells on the presynaptic side. *J Neurosci.*, v. 8, p. 1469-1478. **1988**
- BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; DUCANCEL, F.; ZENOUBAKI, I.; BEN KHALIFA, R.; BORCHANI, L.; PELHATE, M.; BOULAIN, J. C.; EL AYEB, M.; MENEZ,

- A. e KAROUI, H. A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. *Eur J Biochem*, v. 238 (3), p. 653-60. **1996**
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília. **1998**
- BUCARETCHI, F.; BARACAT, E.C.E.; NOGUEIRA, R.J.N.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F.A.D.; FONSECA, M.R.C.C.; TOURINHO, F.S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 37, n. 4. **1995**
- BUCARETCHI, F.; VINAGRE, A.M.; CHAVÉZ-OLÓRTEGUI, C.; COLLARES, E.F. Effect of toxin- γ from *Tityus serrulatus* scorpion venom on gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res.*, v. 32(4), p. 431-4. **1999**
- BUCARETCHI, F.; ZAMBRONE, F.A.D.; FONSECA, M.R.C.C.; DOUGLAS, J.L.; TOURINHO, F.S. Severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. In *Tel Aviv: International Society on Toxinology* (ed). World Congress on Animal, Plant and Microbia Toxins, 11 – Abstracts. **1994**
- BÜCHERL, W. Acúleos que matam. São Paulo, *Revistas dos tribunais*, p.153. **1979**
- BÜRCHEL, W. Venomous animals and their venoms. In: W. Burcherl e E. Buckley (Ed.). New York: Academic Press, v. 111, p. 317-348. **1971**
- CALDERON-ARANDA, E. S.; OLAMENDI-PORTUGAL, T. e POSSANI, L. D. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine*, v.13(13), p.1198-206. **1995**
- CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D.; MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K^+ channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, v. 296 (5852), p. 90-91. **1982**

- CARBONELL, L.F.; HODGE, M.R.; TOMALSKI, M.D.; MILLER, L.K. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene*, v. 73, p. 409–418. **1988**
- CARDOSO, F.; PACÍFICO, L.G.G.; CARVALHO, D.C.DE ; VICTORIA, J.M.; NEVES, A.L.G.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels. *Toxicon*, v. 41 (7), p. 755-763. **2003**
- CARMO, A.O. Expressão Heteróloga e Purificação da Tityustoxina: Obtenção da proteína recombinante Ts3 do escorpião *Tityus serrulatus*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. **2011**
- CARNEIRO, A.; KUSHMERICK, C.; KOENEN, J.; ARNDT, M.H.L.; CORDEIRO, M.N.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M.A.M.; PRADO, V.F. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K⁺ channels. *Toxicon*, v. 41, p. 305-313. **2003**
- CASTLE, N.A.; HAYLETT, D.G.; JENKINSON, D.H. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci.*, v. 12, p. 59-65. **1989**
- CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 64, p. 493-531. **1995**
- CATTERALL, W.A.; CELESTE, S.; YAROVY-Y, V.; YU, F.H.; KONOKI, K.; SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, v. 49, p.124–141. **2007**
- CATTERALL, W.A.; GOLDIN, A.L.; WAXMAN, S.G. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.*, v. 57(4), p. 397-409. **2005**

- CECCHINI, A.L.; VASCONCELOS, F.; AMARA, S.G.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TxTS-V on neurotransmitter uptake *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 217(2), p. 196-203. **2006**
- CELESTE HENRIQUES, M.; GAZZINELLI, G.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V. Effect of the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* on adrenal gland catecholamines. *Toxicon*, v. 5(3), p. 175-9. **1968**
- CESTÈLLE, S.; CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochemie*, v. 82(9- 10), p. 883-892. **2000**
- CESTÈLLE, S.; QU, Y.; ROGERS, J.C.; ROCHAT, H.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron.*, v. 21(4), p. 919-931. **1998**
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; FERREIRA, A.M.; FERREIRA, A.P.; DINIZ, C.R. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v. 35(2), p. 213-21. **1997**
- CHAVEZ-OLÓRTEGUI, 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.*, v. 38(11),p.867-876. **2002**
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MOREIRA FERREIRA, A.M.; CORDEIRO, M.N.; MARIA, W.S.; RICHARDSON, M.; DINIZ, C.R. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello Campos). In *Envenomings and Their Treatments* (Bon, C. & Goyffon, M., eds), p. 183-195. **1996**
- CHEJANOVSKY, N.; ZILBERBERG, N.; RIVKIN, H.; ZLOTKIN, E.; GUREVITZ, M. Functional expression of an alpha anti-insect scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopterous larvae. *Febs Letters*, v. 376, p. 181-184. **1995**

- CHO, D.; SHIN, S. J.; TALAAT, A. M. e COLLINS, M. T. Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Protein Expr Purif*, v.53(2), p.411-20. **2007**
- CLEMENTE, G.T.; TEIXEIRA, M.M.; FREIRE-MAIA, L.; ROSSONI, R.B. Mechanisms underlying the structural alterations of the rat submandibular gland induced by *Tityus serrulatus* Tityustoxin. *Toxicon*, v. 40(6), p. 731-738. **2002**
- COLOGNA, C.T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein Pept Lett*, v. 16(8), p. 920-32. **2009**
- COLOGNA, C.T.; PEIGNEUR, S.; ROSA, J.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; VARANDA, W.A.; TYTGAT, J.; ARANTES, E.C. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.58 , p. 54–61. **2011**
- COLOGNA CT, PEIGNEUR S, RUSTIGUEL JK, NONATO MC, TYTGAT J, ARANTES EC. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. *FEBS J.* , v. 279(8), p.1495-504. **2012**
- CONCEIÇÃO, I.M.; LEBRUN, I.; CANO-ABAD, M.; GANDIA, L.; HERNANDEZ-GUIJO, J.M.; LOPEZ, M.G.; VILLARROYA, M.; JURKIEWICZ, A.; GARCIA, A.G. Synergism between toxin-gamma from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and veratridine in chromaffin cells. *Am J Physiol.*, v. 274(6), p.1745-54. **1998**
- CORONA, M.; GURROLA, G.B.; MERINO, E.; CASSULINI, R.R.; VALDEZ- CRUZ, N.A.; GARCÍA, B.; RAMÍREZ-DOMÍNGUEZ, M.E.; CORONAS, F.I.V.; ZAMUDIO, F.Z.; WANKE, E.; POSSANI, L.D. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Lett.*, v. 532(1-2), p. 121-126. **2002**

- CORONAS, F.V.; DE ROODT, A.R.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; ZAMUDIO, F.Z.; BATISTA, C.V.F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L.D. Disulfide bridges and blockage of *Shaker* B K⁺-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion. *Toxicon*, v. 41(2), p.173-179. **2003**
- CORRADO, A.P.; ANTONIO, A.; DINIZ, C.R. Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*), an unusual sympathetic post-ganglionic stimulant. *J. Pharmac. exp. Ther.*, v. 164, p. 253. **1968**
- CORRÊA, M.M.; SAMPAIO, S.V.; LOPES, R.A.; MANCUSO, L.C.; CUNHA, O.A.; FRANCO, J.J.; GIGLIO, J.R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*, v. 35(7), p. 1053-67. **1997**
- COUTINHO-NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da tityustoxina. Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte. **1975**
- COUTO, A.S.; MORAES-SANTOS, T.; AZEVEDO, A.D.; ALMEIDA, A.P.; FREIRE-MAIA, L. Effects of toxin Ts-gamma, purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom, on the isolated rat atria. *Toxicon*, v. 30(3), p. 339-43. **1992**
- CRUZ, J.S.; MATAVEL, A.C.S.; LEÃO-FILHO, H.M.; MORAES-SANTOS, T.; BEIRÃO, P.S.L. Tityustoxin effect on nerve compound action potentials requires extracellular sodium. *Neuroscience Lett.*, v. 282(1-2), p. 25-28. **2000**
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Escorpionismo. In: CARDOSO JLC; FRANÇA FOS; FAN FW; MÁLAQUE CM & HADDAD Jr. V, eds. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier, São Paulo, p.182-197. **2003**
- CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; OLIVEIRA, J.S.; HERING, S.E. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 36(1), p. 67-76. **1994**
- DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. v.65, p. 1-105. **2001**

- DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; ARANTES, E.C.; DE NUCCI, G. AND ANTUNES, E. Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Urology*, v. 62, p. 581–588. **2003**
- DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol*, v. 264 (2), p. C361-9. **1993**
- DELOREY, T.M.; KISSIN, I.; BROWN, P.; BROWN, G.B. Barbiturate-benzodiazepine interactions at the gamma-aminobutyric acid A receptor in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. *Anesth Analg.*, v. 77(3), p.598-605. **1993**
- DENAC, H.; MEVISSSEN, M.; SCHOLTYSIK, G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Arch. Pharmacol.*, v. 362(6), p. 453-479. **2000**
- DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E.R.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A.P.; GRANIER, C.; CRUZ, J.S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon*, v. 56(8), p. 1426-35. **2010**
- DINIZ, C. R.; GONÇALVES, J. M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. *Biochim. Biophys.*, v.41, p.470. **1960**.
- DINIZ, C. R.; GONÇALVES, J. M. Some chemical and pharmacological properties of Brazilian scorpion venoms. In: BUCKLEY, E., PORGES N. *Venoms*. Washington: A. A. A. S. Press, v. 44, p.131-139. **1956**
- DIOCHOT, S.; LORET, E.; BRUHN, T.; BÉRESS, L.; LAZDUNSKI, M. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol Pharmacol.*, v. 64, p. 59–69. **2003**
- ECCLES, C.U.; ROGOWSKI, R.S.; GU, X.; ALGER, B.E.; BLAUSTEIN, M.P. Tityustoxin-K α , from scorpion venom, blocks voltage-gated, non-inactivating

- potassium current in cultured central neurons. *Neuropharmacol.*, v. 33(12), p. 1523-1528. **1994**
- EICKSTEDT, V.R.D.; CANDIDO, D.M.; JORGE, M.T.; ALBUQUERQUE, M.J.; RIBEIRO, L. A. Escorpionismo no Estado de São Paulo: ocorrência de *Tityus serrulatus* e *T. bahiensis*, frequência de acidentes e gravidade dos envenenamentos. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 27, p. 56. **1994**
- ENNA, S.J.; SNYDER, S.H. Properties of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in the rat brain synaptic membrane fractions. *Brain Res.*, v. 100, p.81-97. **1975**
- FALQUETO, E.B.; MASSENSINI, A.R.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A. Modulation of Na⁺-channels by neurotoxins produces different effects on [3H]ACh release with mobilization of distinct Ca²⁺-channels. *Cell Mol Neurobiol.* v. 22(5-6), p. 819-26. **2002**
- FELICORI, L.; ARAÚJO, S.C.; MACHADO DE ÁVILA, R.A.; SANCHEZ, E.F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon*, v. 48, p. 509-519, **2006**
- FERNANDES, V.M.; MASSENSINI, A.R.; PRADO, M.A.; SILVA, M.A.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M.V. Effects of alpha-scorpion toxin, tityustoxin on the release of [3H] dopamine of rat brain prefrontal cortical slices. *Neurochem Int.*, v. 44(2), p. 91-7. **2004**
- FERNANDES, V.M.; NICOLATO, R.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, R.S.; PRADO, M.A.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. Beta-scorpion toxin induces the release of gamma-[3H] aminobutyric acid in rat brain slices. *Neuroreport.*, v. 12(13), p. 2911-3. **2001**
- FERREIRA, L.A.; ALVES, E.W.; HENRIQUES, O.B. Peptide T, a novel bradykinin potentiador isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v. 31(8), p. 941-947. **1993**
- FLETCHER, P.L.; FLETCHER, M.; FAINTER, L.K.; TERRIAN, D.M. Action of New

- World scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon*, v. 34(11-12), p.1399-411. **1996**
- FLETCHER, P.L.; FLETCHER, M.D.; WENINGER, K.; ANDERSON, T.E.; MARTIN, B.M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J Biol Chem.*, v. 285(10), p. 7405-16. **2010**
- FONNUM, F. Glutamate a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem.*, v. 42, p. 1-11. **1984**
- FONTECILLA-CAMPS, J.C.; HABERSETZER-ROCHAT, C.; ROCHAT, H. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 85(20), p. 7443-7447. **1988**
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning, In: *Natural toxins. Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. Pergamon Press, Oxford. **1989**
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A.; AMARAL, C.F. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*, v. 32 (9), p. 1009-1014. **1994**
- GABRIELSEN, O.S.; REPPE, S.; SÆTHER, O.; BLINGSMO, O.R.; SLETTEN, K.; GORDELADZE, J.O.; HØGSET, A.; GAUTVIK, V.T.; ALESTROM, P.; OYEN, T.B.; GAUTVIK, K.M. Efficient secretion of human parathyroid hormone by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, v. 90, p. 255–262. **1990**
- GALVEZ, A.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; REUBEN, J. P.; ROY-CONTANCIN, L.; FEIGENBAUM, P.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification and Characterization of a unique, potent, peptidyl-probe for the high-conductance calcium-activated potassium channel from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 11083- 11090. **1990**
- GARCIA, M.L.; GAO, Y.; MCMANUS, O.B.; KACZOROWSKI, G.J. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon*, v. 39(6), p. 739-748. **2001**

- GARCIA, C.; CALDERON-ARANDA, E. S.; ANGUIANO, G. A.; BECERRIL, B. e POSSANI, L. D. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius Hoffmann*. *Toxicon*, v.41(4), p.417-27. **2003**
- GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol.*, v. 52, p. 6-15. **1997**
- GIMENEZ-GALLEGO, G.; NAVIA, M. A.; REUBEN, J. P.; KATZ, G. M.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification, sequence and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium - activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 85, p. 3329-3333. **1988**
- GIGOVA, L.; WISHART, P.; USCHEVA, A.; IVANOVA, M.; BARDAROV, S.; JAY, E. e IVANOV, I. Expression of repetitive human calcitonin genes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, v.11, n.4, Aug, p.401-12. **1989**
- GOMEZ, M. V. e DINIZ, C. R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem Inst Butantan*, v. 33 (3), p. 899-902. **1966**
- GOMEZ, M. V. Purificação e caracterização da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*. Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte. **1967**
- GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A.; PRADO, M.A.M. Effects of tityustoxin on central nervous system. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, v. 14, p. 437-456. **1995**
- GONÇALVES, A.A.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; BOSCHERO, A.C. Participation of Na⁺ channels in the potentiation by *Tityus serrulatus* α -toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet β -cells. *Toxicon*, v. 41(8), p. 1039-1045. **2003**
- GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M.; ZINN-JUSTIN, S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J. Toxicol - Toxin Rev.*, v.17, p.131-159. **1998**

- GOUDET, C.; CHI, C.W.; TYTGAT, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, v. 40(9), p. 1239-1258. **2002**
- GUATIMOSIM, S. C.; PRADO, V. F.; DINIZ, C. R.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. e KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.37(3), p.507-17. **1999**
- GUATIMOSIM, S. C.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R. e CHAVÉZ-OLÓRTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon*, v.38 (1), p.113-21. **2000**
- GUERON, M.; OVSYSHCHER, I. What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation? *Toxicon*, v. 25(2), p. 121-124. **1987**
- GWEE, M.C.E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R.M.; CHEAH, L.S. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Cli.Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 29, p. 795-801. **2002**
- HARLOW, E. e LANE, D. Antibodies. In: C. S. H. Laboratory (Ed.). *A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, **1988**. Antibodies
- HASSANI, O.; MANSUELLE, P.; CESTELE, S.; BOURDEAUX, M.; ROCHAT, H.; SAMPIERI, F. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts gamma) from the scorpion *Tityus serrulatus*. *Eur. J. Biochem.*, v. 260(1), p. 76-86. **1999**
- HERING, S.E.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P. Escorpionismo. In: S. Schvartsman (Ed.). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier. Escorpionismo, p.216-227. **1992**
- HILLE, B. Mechanism of block In: *Ionic channels of excitable membranes*, Sunderland: Sinder assoc Inc., p. 390-422. **1992**

- HOLADAY, S.K.Jr.; MARTIN, B.M.; FLETCHER, P.L.Jr.; KRISHNA, N.R. NMR Solution structure of butantoxin. Arch. Biochem. Biophys., v. 379(1), p. 18-27. **2000**
- HOUSSET, D.; HEBERSETZER-ROCHAT, C.; ASTIER, J.P.; FONTECILLA-CAMPS, J.C. Cristal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector* refined at 1.3 resolution. J. Mol. Biol., v. 238(1), p. 88-103. **1994**
- ISHIKAWA, H. e TAMAOKI, H. Production of human calcitonin in *Escherichia coli* from multimeric fusion protein. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.82(2), p.140-144. **1996**
- ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. Toxicon, v. 33, p. 825-858. **1995**
- JONAS, P.; VOGEL, W.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R. Toxin γ of the scorpion *Tityus serrulatus* modifies both activation and inactivation of sodium permeability of nerve membrane. Pflügers Arch., v. 407(1), p. 92-99. **1986**
- JOVER, E.; COURAUD, F. e ROCHAT, H. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. Biochem Biophys Res Commun, v.95(4), p.1607-14. **1980**
- JOVER, E.; MARTÍN MOUTO, T.N.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions and other neurotoxins. Biochemistry, v. 19(3), p. 463-467. **1986**
- KALAPOTHAKIS E, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. Toxicon. v. 35(10), p. 1523-9. **1997**
- KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DECASTRO, C.S.; MENDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. Toxicon, v. 40, n. 12, p. 1691-1699. **2002**
- KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C.; SILVESTRE, F.; LABORNE, F.; DEMOURA, J.; VEIGA, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO K.C. The Loxtox

protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom? *Toxicon*, v. 50, p. 938-946. **2007**

KALAPOTHAKIS, E.; JARDIM, S.; MAGALHÃES, A.C.; MENDES, T.M.; DE MARCO, L.; AFONSO, L.C.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, v. 39(5), p. 679-685. **2001**

KALAPOTHAKIS, E.; KUSHMERICK, C.; GUSMÃO, D.; FAVARON, G.O.C.; FERREIRA, A.J.; GOMEZ, M.V.; ALMEIDA, A.P. Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon*, v. 41, n. 1, p. 23-28. **2003**

KALAPOTHAKIS, E.; PENAFORTE, C.L.; BEIRÃO, P.S.L.; ROMANO-SILVA, M.A.; CRUZ, J.S.; PRADO, M.A.M.; GUIMARÃES P.E.M.; GOMEZ, M.V.; PRADO, V.F. Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, v. 36, p. 1843-1850. **1998**

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

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

KOROLKOVA, Y.V.; BOCHAROV, E.V.; ANGELO, K.; MASLENNIKOV, I.V.; GRINENKO, O.V.; LIPKIN, A.V.; NOSYREVA, E.D.; PLUZHNIKOV, K.A.; OLESEN, S.P.; ARSENIIEV, A.S.; GRISHIN, E.V. New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 43104–43109. **2002**

KOU, G.; SHI, S.; WANG, H.; TAN, M.; XUE, J.; ZHANG, D.; HOU, S.; QIAN, W.; WANG, S.; DAI, J.; LI, B. e GUO, Y. Preparation and characterization of recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, v.52(1), p.131-8. **2007**

- KREIL, G. Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. *Protein Sci.*, v. 4(9), p. 1666-1669. **1995**
- KROGSCAARD-LARSEN, P.; FROLUND, B.F.; FALCH, E. Inhibitors of gamma-aminobutyric acid transport as experimental tools and therapeutics agents. *Methods Enzymol.* v. 296, p. 165-175. **1998**
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 227(5259), p. 680-5. **1970**
- LANGLEY, K.; GRANT, N.J. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? *Neurochem Int., Oxford*, v. 31, p. 739-57. **1997**
- LAZDUNSKI, M. Voltage-dependent channels in the skeletal-muscle. *Muscle Nerve*, v. 9(5), p. 3-3. **1986**
- LEGROS C.; BOUGIS P.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Genomic organization of the KTX2 gene, encoding a “short” scorpion toxin active on K⁺ channels. *FEBS Lett.*, v. 402, p. 45–49. **1997**
- LEGROS, C.; CEARD, B.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett.*, v.431, n. 3, p. 375-80. **1998**
- LEGROS, C.; OUGHUIDENI, R.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. *FEBS Lett.*, v. 390(1), p. 81-84. **1996**
- LEGROS, C.; SCHULZE, C.; GARCIA, M. L.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. e PONGS, O. Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. *Biochemistry*, v.41(51), p.15369-75. **2002**
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios - conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Editora Atheneu. **2004**

- LESTER, D.; LAZAROVICI, P.; PELHATE, M.; ZLOTKIN, E. Purification, characterization and action of two insect toxins from the venom of the scorpion *Buthotus judaicus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 701(3), p. 370-381. **1982**
- LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2(10), p. 790-802. **2003**
- LIKES, K.; BANNER, Jr.W.; CHAVEZ, M. *Centruloides exilicauda* envenomation in Arizona. *Western Journal of Medicine*, v. 3, p. 25-26. **1984**
- LIMA, E.G.; FREIRE-MAIA, L. Cardiovascular and respiratory effects induced by intracerebroventricular injection of scorpion toxin (tityustoxin) in the rat. *Toxicon*, v. 15(3), p. 225-234. **1977**
- LOBATO, F.C.F.; LIMA, C.G.R.D.; ASSIS, R.A.; PIRES, P.S.; SILVA, R.O.S.; SALVARANI, F.M.; CARMO, A.O.; CONTIGLI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, v. 28, p. 6125-6127. **2010**
- LOMBET, A.; LAZDUNSKI, M. Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using Tityus toxin-gama. *Eur. J. Biochem.*, v. 141, p. 651-660. **1984**
- LOURENÇO, W.R. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. *Biogeographica*, v. 70, p. 155-160. **1994**
- LOURENÇO, W.R.; LEGUIN, E.A. The true identity of *Scorpio (Atreus) obscurus* Gervais, 1843 (Scorpiones, Buthidae). *Euscorpius - Occasional Publications in Scorpiology*, n. 75. **2008**
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193(1), p. 265-75. **1951**
- MAEDA, S.; VOLRATH, S.L.; HANZLIK, T.N.; HARPER, A.; MAJIMA, K.; MADDOX, D.W.; FOWLER, E. Insecticidal effects of an insect-specific

neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology*, v. 184, p. 777-780. **1991**

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, v. 60(3), p. 512-38. **1996**

MAMELAK, A.N.; ROSENFELD, S.; BUCHOLZ, R.; RAUBITSCHKE, A.; NABORS, L.B.; FIVEASH, J.B.; SHEN, S.; KHAZAELI, M.B.; COLCHER, D.; LIU, A.; OSMAN, M.; GUTHRIE, B.; SCHADE-BIJUR, S.; HABLITZ, D.M.; ALVAREZ, V.L.; GONDA, M.A. Phase I single-dose study of intracavitary administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J. Clin. Oncol.* v. 24, p. 3644–3650. **2006**

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

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

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

MARCUSSI, S.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Escorpiões. *Biologia, envenenamento e mecanismo de ação de suas toxinas*. Editora FUNPEC, 1ª edição. São Paulo. **2011**

MARSTON, F.A.O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, v. 240, p. 1–12. **1986**

- MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; BECHIS, G.; EL AYEB, M.; SAMPIERI, F.; BRANDO, T.; DINIZ, C.R.; ROCHAT, H. Purification and characterization of eight toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.23, p.594. **1985**
- MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A.M.; DINIZ, C.R.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.*, v. 302, n. 3, p.220-2. **1992**
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H. e BOUGIS, P. E. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett*, v.342(2), p.181-4. **1994**
- MASSENSINI, A.R.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. *Neuropharmacology*, v. 37(3), p. 289-97. **1998**
- MASSENSINI AR, ROMANO-SILVA MA, GOMEZ MV. Sodium channel toxins and neurotransmitter release. Review. *Neurochem Res.*, v. 28(10), p.1607-11. **2003**
- MATAVEL, A; CRUZ, J.S.; PENAFORTE, C.L.; ARAUJO, D.A.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, V.F.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; BEIRÃO, P.S. Electrophysiological characterization and molecular identification of the Phoneutria nigriventer peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.*, v. 523, p. 219. **2002**
- MEDYNSKI, D.; TUAN, M.; LIU, W.; WU, S. e LIN, X. Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif*, v.52(2), p.395-402. **2007**
- MENDES, T.M.; DIAS, F.; HORTA, C.; PENA, I.; ARANTES, E.; KALAPOTHAKIS, E. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon*, v. 52, p. 787-793. **2008**
- MENDES, T.M. Antígenos para a produção de soro contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em

Fisiologia Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia. **2007**

MENDES, T.M.; MARIA, W.S.; 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*, v. 44, n. 6, p. 617-24. **2004**

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL **2012**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31510]

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

MOHAMED, A.H. Preparation of anti-scorpion serum. Use of atropine and ergotoxine. *Lancet*, v. 243, p. 364-365. **1942**

MOORE, J. T.; UPPAL, A.; MALEY, F. e MALEY, G. F. Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr Purif*, v.4(2), p.160-3. **1993**

MOREIRA-FERREIRA, A.M.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon*, v. 36(2), p. 333-9. **1998**

NICHOLSON, G.M. Fighting the global pest problem: preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, v. 49, p. 413-422. 2007

- NICOLATO, R.; FERNANDES, V.M.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, R.S.; PRADO, M.A.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. Release of gamma-[(3)H] aminobutyric acid in rat brain cortical slices by alpha-scorpion toxin. *Neurosci Lett.*, v. 325(3), p. 155-158. **2002**
- NOVELLO, J.C.; ARANTES, E.C.; VARANDA, W.A.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. TsTx-IV, a short chain fourdisulfide-bridge neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom, which acts on Ca²⁺- activated K⁺ channels. *Toxicon*, v. 37(4), p. 651-660. **1999**
- OREN, D.A.; FROY, O.; AMIT, E.; KLEINBERGER-DORON, N.; GUREVITZ, M.; SHAANAN, B. Excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure*, v. 6(9), p. 1095-1103. **1998**
- OYAMA Jr.S.; PRISTOVSEK, P.; FRANZONI, L.; PERTINHEZ, T.A.; SCHININA, E.; LUCKE, C.; RUTERJANS, H.; ARANTES, E.C.; SPISNI, A. Probing the pH-dependent structural features of alfa-KTx12.1 a potassium channel blocker from the scorpion *Tityus serrulatus*. *Protein Sci.*, v. 14(4), p. 1025-1038. **2005**
- PANG, S.; OBERHAUS, S. M.; RASMUSSEN, J. L.; KNIPPLE, D. C.; BLOOMQUIST, J. R.; DEAN, D. H.; BOWMAN, K. D.; SANFORD, J. C. Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plants. *Gene*, v. 116, p. 165-172. **1992**
- PARK, C.S.; HAUSDORFF, S.F.; MILLER, C. Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 15;88(6), p. 2046-50. **1991**
- PARMA, M.J.A. Escorpionismo por *Tityus trivitattus* Hospital de Niños Eva Perón. Catamarca. **2006**
- PARSELL, D. A. e SAUER, R. T. The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, v.264(13), p.7590-5. **1989**

- PENAFORTE, C.; PRADO, V.F.; PRADO, M.A.M.; ROMANO-SILVA, M.A.; GUIMARÃES, P.E.M.; MARCO, L.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, v. 38, p. 1443-1449. **2000**
- PESSINI, A.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D.; MACHADO, R.; SOARES, D.; FIGUEIREDO, M.; KALAPOTHAKIS, E.; SOUZA, G. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. *Toxicon*, v. 52, p. 729-736. **2008**
- PESSINI, A.C.; DE SOUZA, A.M.; FACCIOLI, L.H.; GREGÓRIO, Z.M.; ARANTES, E.C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int Immunopharmacol.*, v. 3(5), p. 765-774. **2003**
- PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, v. 39, p. 1495-1504. **2001**
- PETRICEVICH, V.L.; HERNÁNDEZ CRUZ, A.; CORONAS, F.I.; POSSANI, L.D. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, v. 50(5), p. 666-75. **2007**
- PETRICEVICH, V.L.; REYNAUD, E.; CRUZ, A.H.; POSSANI, L.D. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. *Clin Exp Immunol.*, v. 154(3), p. 415-23. **2008**
- PIMENTA, A.M.C.; MANSUELLE, P.; DINIZ, C.R.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved α -KTx12.1, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus* venom. *J. Pept. Sci.*, v. 9(2), p. 132-140. **2003**
- PINHEIRO, C.B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into

- interactions with Na⁺ channels. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, v. 59(3), p. 405-415. **2003**
- POLIKARPOV, I.; JUNIOR, M.S.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; TEPLYAKOV, A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. *J. Mol. Biol.*, v. 290(1), p. 175-184. **1999**
- POLIS, G.A. *The Biology of Scorpions*. Stanford University Press, p. 587. **1990**
- POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.*, v. 264, p. 287-300. **1999**
- POSSANI, L.; MARTIN, B.M.; SVENDSEN, I.; RODE, G.S.; ERICKSON, B.W. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem. J.*, v. 229(3), p. 739-750. **1985**
- POSSANI, L.D.; ALAGÓN, A.C.; FLETCHER JR., P.L.; ERICKSON, B.W. Purification and properties of mammalian toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Archs. Biochem. Biophys.*, v. 180(2), p. 394-403. **1977**
- POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European Journal of Biochemistry*, v. 264, p. 287-300. **1999**
- POSSANI, L.D.; MARTIN, B. M.; MOCHCA-MORALES, J.; SVENDSEN, I. purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun.*, v. 46, p. 195-205. **1981**
- POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; SVENDSEN, I. The primary structure of noxiustoxin: A K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.*, v. 47, p. 285-289. **1982**

- PUCCA, M.B. Seleção e produção de fragmentos de anticorpos humanos (scFv) pela tecnologia de “Phage Display” capazes de inibir a ação da toxina TsTx-I “*in vitro*” e a toxicidade do veneno do escorpião amarelo – *Tityus serrulatus* “*in vivo*”. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. **2009**
- PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARRELL, D.A.; DESAKORN, V.; MCMICHAEL, A.J.; WHITE, N.J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon*, v. 26(7), p. 629-637. **1988**
- RABBANI, S. A.; YASUDA, T.; BENNETT, H. P.; SUNG, W. L.; ZAHAB, D. M.; TAM, C. S.; GOLTZMAN, D. e HENDY, G. N. Recombinant human parathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli*. Purification and characterization. *J Biol Chem*, v.263(3), p.1307-13. **1988**
- REGEV A.H.; RIVKIN, B.; INCEOGLU, E.; GERSHBURG, B.; HAMMOCK, D.; GUREVITZ, M.; CHEJANOVSKY, N. Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Lett.*, v. 537, p. 106–110. **2003**
- REVELO, M.P.; BAMBIRRA, E.A.; FERREIRA, A.P.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, v. 34(10), p. 1119-1125. **1996**
- REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.; FREIRE-MAIA, L. Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. *Toxicon*, v. 36 (11), p. 1507-13. **1998**
- ROBBINS, J. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther.*, v. 90, p. 1–19. **2001**
- ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FACA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O. e FRANCA, S. C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. *Protein Expr Purif*, v.37(1), p.102-8. **2004**

- RODRIGUES, A.R.A.; ARANTES, E.C.; MONJE, F.; STÜHMER, W.; VARANDA, W.A. Tityustoxin-K(alpha) blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Br. J. Pharmacol.*, v. 139(6), p. 1180-1186. **2003**
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C.; MERINO, E.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 24(9), p. 222-227. **2003**
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C.; POSSANI, L.D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*, v. 43(8), p. 865- 875. **2005**
- ROGOWSKI, R.S.; KRUEGER, B.K.; COLLINS, J.H.; BLAUSTEIN, M.P. Tityustoxin K α blocks voltage-gated non-inactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by α -dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 91(4), p. 1475- 1479. **1994**
- ROSSI, D.J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, v. 403(6767), p.316-321. **2000**
- RUDOLPH, R. & LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB Journal*, v. 10, p. 49-56. **1996**
- RUDOLPH, R.; LILIE, H.; SCHWARZ, E. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, v. **9**, p. 497-501. **1998**
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHAT, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. e ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Termostable DNA polymerase. *Science*, v.239, p.487-491. **1988**
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Col Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 2 e 3. **1989**
- SAMPAIO, S. V.; LAURE, C. J. e GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, v.21 (2), p.265-77. **1983**

- SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPPO NETO, F.; GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T1IV (TsTXIII) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v. 29(6), p. 663 - 672. **1991**
- SAMPAIO, S.V.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Isolation of toxin TsTX-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v. 39(4), p. 729- 740. **1996**
- SAMPAIO, S.V.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E.C.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C. e GIGLIO, J.R. TsTX-VII, a new toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom able to induce the release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes not blocked by tetrodotoxin. *Biochem Mol Biol Int*, v.41 (6), p.1255-63. **1997**
- SANDOVAL, M.R.L.; LEBRUN, I. TsTx toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom induces spontaneous recurrent seizures and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, v. 44(7), p. 904-911. **2003**
- SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSO; A.R. n, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, p. 5463-5467. **1977**
- SHIEH, C.C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.*, v. 52(4), p. 557-593. **2000**
- SILVA, R.M.L.; AMORIM, A.M.; BRAZIL, T.K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones;Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33(3), p. 239-245. **2000**
- SILVEIRA, N.P.; MORAES-SANTOS, T.; AZEVEDO, A.D.; FREIRE-MAIA, L. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and one of its purified toxins (toxin

- gamma) on the isolated guinea-pig heart. *Comp Biochem Physiol C.*, v. 98(2-3), p. 329-36. **1991**
- SIMARD, J.M. & WATT, D.D. Venoms and toxins. In: *The biology of scorpions* (Polis GA, ed). Stanford Ca, USA: Stanford University Press, p. 414-44. **1990**
- SMITH, L. A.; LAFAYE, P. J.; LAPENOTIERE, H. F.; SPAIN, T.; DOLLY, J. O. Cloning and functional expression of dendrotoxin-K from black mamba, a K⁺ channel blocker. *Biochemistry*, v. 32, p. 5692-5697. **1993**
- SORENSEN, H. P. e MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, v.4(1),p.1. **2005**
- SOUZA, A.M; REIS, J.K.; ASSIS, R.A.; HORTA, C.C.; SIQUEIRA, F.F.; FACCHIN, S.; ALVARENGA, E.R.; CASTRO, C.S.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.; PIRES, P.S.; CONTIGLI, C.; LOBATO, F.C.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genet Mol Res.*, v. 9(1), p. 266-76. **2010**
- SUN, Y.M.; BOSMANA, F.; ZHU, R.H.; GOUDET, C.; XIONG, Y.M.; TYTGAT, J.; WANG, D.C. Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion alpha-like toxin BmK M1: the hydrophobic surface region revisited. *J. Biol. Chem.*, v. 278(26), p. 24125- 24131. **2003**
- SWARTZ, K.J.; MACKINNON, R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron.*, v. 15(4), p. 941-9. **1995**
- TEIXEIRA, C.E.; DE OLIVEIRA, J.F.; BARACAT, J.S.; PRIVIERO, F.B.; OKUYAMA, C.E.; RODRIGUES NETTO JR., N.; FREGONESI, A.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology*, v. 63(1), p. 184-189. **2004**
- THIM L, M.T.; HANSEN, K.; NORRIS, I.; HOEGH, E.; BOEL, J.; FORSTROM, G.; AMMERER, N.P.; FIIL. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 6766–6770. **1986**

- TOLEDO, D.V.; NEVES, A.G.A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. *Comp.Biochem. Physiol.*, v. 55B, p. 249-253. **1976**
- TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B.; MARTINI, R. K.; BORGES, C. V. A. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Rev. Saúde Pública.*, v.36 (5), p. 631-633. **2002**
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T. e GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.76 (9), p.4350-4. **1979**
- TU, A.T.; HENDON, R.R. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp. Biochem.Physiol. B.*, v. 76(2), p. 377-981. **1983**
- TURKOV, M.; RASHI, S.; NOAM, Z.; GORDON, D.; BEN KHALIFA, R.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. e GUREVITZ, M. In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, v.10(1), p.123-31. **1997**
- TYTGAT, J.; CHANDY, K.G.; GARCIA, M.L.; GUTMAN, G.A.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; VAN DER WALT, J.J.; POSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 20(11), p. 444-447. **1999**
- ULLRICH, N.; GILLESPIE, G.Y.; SONTHEIMER, H.; Human astrocytoma cells express a unique chloride current. *Neuroreport*, v. 7, p. 343-347. **1995**
- VALDIVIA, H.H.; KIRBY, M.S.; LEDERER, W.J. e CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89 (24), p.12185-9. **1992**
- VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V.L.; BENDHACK, L.M. GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C. Effects of voltage-gated Na^{+} channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma

- catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology - part C*, v. 141, p. 85-92. **2005**
- VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.A.S.; PIMENTA, A.M.C. *Tityus serrulatus* Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 371(3), p. 501-504. **2008**
- VILLAVERDE, A. e CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, v.25(17), p.1385-95. **2003**
- VITAL BRAZIL, O.; NEDER, A.C.; CORRADO, A.P. Effects and mechanism of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. *Pharmacol. Res. Commun.*, v. 15, p. 137-140. **1973**
- VIULLARD, L. e FREEMAN, A. *Molecular Biology Protocols: Preparation of native proteins from inclusion bodies*. University de St. Andrews U. K.: Disponível em: <<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.nwfsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>>.
- WALSH, K.A.; WILCOX, P.E. Serine proteases. *Meth. Enzymol.*, v. 19, p. 31-41. **1970**
- WANG, S.Y.; WANG, G.K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal*, v. 15(2), p. 151-159. **2003**
- WARNER, L. R.; BLASICK, C. M.; BROWN, R. J. e OXFORD, J. T. Expression, purification, and refolding of recombinant collagen alpha1(XI) amino terminal domain splice variants. *Protein Expr Purif*, v.52(2), p.403-9. **2007**
- WATT, D.D.; SIMARD, J.M. Neurotoxic proteins in scorpion venom. *J. Toxicol. (Toxin Rev.)*, v.3, p. 181-221. **1984**
- WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D. H.; BEST, E. A. e OLINS, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, v.7(5), p.494-9. **1996**

- WERKMAN, T.R.; GUSTAFSON, T.A.; ROGOWSKI, R.S.; BLAUSTEIN, M.P.; ROGAWSKI, M.A. Tityustoxin-K α , a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the α -dendrotoxin binding site on a cloned Kv1.2 K⁺ channel. *Mol. Pharmacol.*, v. 44(2), p. 430-436. **1993**
- WILSON, W.H. On the venom of Scorpions. *Rec. Egypt. Gov. School. Med.*, v. 2, p. 9-44. **1904**
- XU, X.; WANG, X.S.; XI, X.T.; LIU, J.; HUANG, J.T.; LU, Z.X. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon*, v. 20(6), p. 973-981. **1982**
- YANG, J.; ZHANG, W.; LIU, K.; JING, S.; GUO, G.; LUO, P. e ZOU, Q. Expression, purification, and characterization of recombinant human interleukin 24 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, v.53(2), p.339-45. **2007**
- YU, F.H.; CATTERALL, W.A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.*, v. 4(3), p. 207.1-207.7. **2003**
- YU, F.H.; CATTERALL, W.A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*, v. 253, p. 15. **2004**
- ZAMUDIO, F.; SAAVEDRA, R.; MARTIN, B.M.; GURROLA-BRIONES, G.; HERION, P.; POSSANI, L.D. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Eur J Biochem*, v. 204 (1), p. 281-92. **1992**
- ZAMUDIO, F.Z.; GURROLA, G.B.; ARÉVALO, C.; SREEKUMAR, R.; WALKER, J.W; VALDIVIA, H.H.; POSSANI, L.D. Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTx(a)), a peptide activator of Ca²⁺ release channels/rynodine receptors. *FEBS Lett.*, v. 405(3), p.385-89. **1997**
- ZHAO, D. X.; DING, Z. C.; LIU, Y. Q. e HUANG, Z. X. Overexpression and purification of single zinc finger peptides of human zinc finger protein ZNF191. *Protein Expr Purif*, v.53(1), p.232-7. **2007**

ZHIJIAN C.; CHAO, D.; SHIJIN, Y.; YINGLIANG, W.; JIQUN, S.; YONGGANG, S.; WENXIN, L. Splicing of scorpion toxin gene BmKK2 in HEK 293T cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, v. 20 (1), p. 1–6. **2006**

ZHU, S.; LI, W.; ZENG, X.; JIANG, D.; MAO, X.; LIU, H. Molecular cloning and sequencing of two ‘short chain’ and two ‘long chain’ K⁺ channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. *FEBS Lett.*, v. 457(3), p. 509-514. **1999**

ZLOTKIN, E.; EITAN, M.; BINDOKAS, V.P.; ADAMS, M.E.; MOYER, M.; BURKHARDT, W.; FOWLER, E. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry*, v. 30(19), p. 4814-4821. **1991**

ZLOTKIN, E.; FISHMAN, Y.; ELAZAR, M. AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie*, v. 82, p. 869-881. **2000**

ZLOTKIN, E.; KADOURI, D.; GORDON, D.; PELHATE, M.; MARTIN, M.F.; ROCHAT, H. An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 240(2), p. 877-887. **1985**