

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



TESE DE DOUTORADO

**BUSCA POR NOVOS ANTÍGENOS PARA A PRODUÇÃO DE  
SORO ANTIESCORPIÔNICO: CONSTRUÇÃO DE ANTÍGENOS  
QUIMÉRICOS E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES DA  
PEÇONHA DE *T. SERRULATUS*.**

ORIENTADO: ANDERSON OLIVEIRA DO CARMO

ORIENTADOR: EVANGUEDES KALAPOTHAKIS

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO - 2015

**Anderson Oliveira do Carmo**

**Busca por novos antígenos para a produção de soro antiescorpiônico: Construção de antígenos quiméricos e caracterização de proteases da peçonha de *T. serrulatus*.**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais com requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Genética.

**Orientador:** Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
Programa de Pós-graduação em Genética  
Belo Horizonte, 2015.

043 Carmo, Anderson Oliveira do.

Busca por novos antígenos para a produção de soro antiescorpiônico: construção de antígenos quiméricos e caracterização de proteases da peçonha de *T. serrulatus* [manuscrito] / Anderson Oliveira do Carmo. – 2015.

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

Orientador: Evanguedes Kalapothakis.

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

1. *Tityus serrulatus* - Teses. 2. Escorpião – Teses. 3. Proteína quimera. 4. Protease. 5. Anticorpos. 6. Anti-veneno. 7. Genética – Teses. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

- Departamento de Biologia Geral – ICB – UFMG;
- Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG;
- Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG;
- Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.



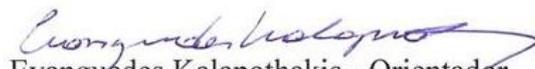
**Pós-Graduação em Genética**  
**Departamento de Biologia Geral, ICB**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

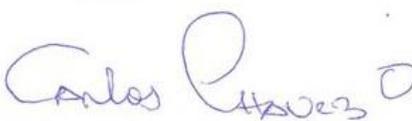


**"Busca por novos antígenos para a produção de soro antiescorpionico:  
Construção de antígenos quiméricos e caracterização de proteases da  
peçonha de T. serrulatus."**

**Anderson Oliveira do Carmo**

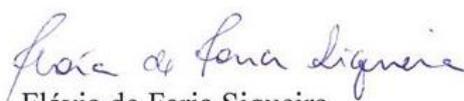
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Evanguedes Kalapothakis - Orientador  
UFMG

  
Carlos Delfin Chávez Olortegui  
UFMG

  
Eladio Oswaldo Flores Sanchez  
FUNED

  
Eliane Candiani Arantes  
USP

  
Flávia de Faria Siqueira  
IFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2015.

Dedico esse trabalho a minha família.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Genética e ao departamento de Biologia Geral pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento desse trabalho e pela oportunidade de aprendizado e convívio com grandes pesquisadores do Brasil.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento desse projeto e pela bolsa de doutorado.

Ao professor Evanguedes Kalapothakis pelo apoio total durante todo o tempo de vivência. Você é um ótimo profissional no qual me espelho, com grande competência, sensibilidade e experiência, que sempre que necessário me indicou a direção certa a seguir para superar as adversidades surgidas durante esse trabalho.

A banca por ter aceitado o convite de participar da arguição da minha tese e pela disponibilidade, tenho certeza que a presença de vocês trará grandes contribuições a esse trabalho.

Aos membros do laboratório do professor Calos Chávez-Olórtegui pela grande ajuda e colaboração durante esse trabalho.

Aos técnicos de laboratório que passaram pelo LBMM, ICB e servidores que sempre me ajudaram nos experimentos mais complexos, em especial ao Jamil.

A toda a família Kalapogruppo (IC's, técnicos, mestrandos, doutorandos, pós docs etc...), a presença de vocês e companheirismo foi crucial para a boa convivência no laboratório e ajuda nesse trabalho. Em especial gostaria de agradecer ao Lucas, Carolina, Bárbaras que me ajudaram MUITO em todo o desenvolvimento. (desculpe por não citar outros nomes, mas tenho medo de deixar alguém de fora 😊).

Aos meus queridos amigos, que tiveram paciência em aturar minhas ausências e neuroses durante esse período. Pela ajuda nas horas complicadas e pelos momentos de descontração super importantes para que eu não me isolasse do mundo.

A toda minha família pelo apoio e compreensão durante esse período. Vocês me ajudaram muito para que eu fosse capaz de escrever e me desenvolver. Em especial aos meus Pais e irmãos que acompanharam mais de perto esse momento. E ao restante da família pelos momentos de descontração em festas e pequenas viagens.

# Sumário

AGRADECIMENTOS .....	VII
SUMÁRIO .....	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES .....	XI
ÍNDICE DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 <i>Escorpiões</i> .....	17
1.2 <i>Escorpionismo</i> .....	18
1.3 <i>Epidemiologia do Escorpionismo</i> .....	19
1.3.1 <i>Velho Mundo</i> .....	19
1.3.2 <i>Novo Mundo</i> .....	20
1.4 <i>Peçonha escorpiônica e toxinas</i> .....	21
1.5 <i>Soro antipeçonha escorpiônico</i> .....	23
1.6 <i>Historia da produção de soro antiescorpiônico em cavalos</i> .....	23
1.7 <i>Formas alternativas de produção de soro antiescorpiônico</i> .....	24
1.7.1 <i>Imunização com peçonha detoxificada</i> .....	24
1.7.2 <i>Imunização com frações tóxicas da peçonha</i> .....	25
1.7.3 <i>Imunização com anatoxinas nativas</i> .....	26
1.7.4 <i>Imunização com toxinas recombinantes</i> .....	26
1.7.5 <i>Imunização com peptídeos sintéticos</i> .....	28
1.7.6 <i>Anticorpos monoclonais contra a peçonha escorpiônica</i> .....	29
1.7.7 <i>Anticorpos recombinantes baseados em antipeçonha escorpiônica</i> .....	30
1.8 <i>Tityus serrulatus</i> .....	31
1.8.1 <i>Epidemiologia de T. serrulatus</i> .....	33
1.8.2 <i>Toxinas de T. serrulatus</i> .....	35
1.8.3 <i>Tratamento de escorpionismo</i> .....	37
1.8.4 <i>Problemas na produção de soro</i> .....	37
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1 <i>Objetivos Específicos</i> .....	41
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 <i>Animais e linhagens de E.coli utilizadas</i> .....	42
4.2 <i>Extração de peçonha de T. serrulatus</i> .....	42
4.3 <i>Busca de clones na Biblioteca de cDNA para a construção de cassetes quiméricos</i> .....	43
4.4 <i>Vetores plasmidiais utilizados</i> .....	43
4.5 <i>Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	43
4.6 <i>Eletroforese em gel de agarose</i> .....	44

4.7	<i>Transformação em E. coli</i> .....	44
4.8	<i>Lise alcalina para purificação plasmidial</i> .....	45
4.9	<i>Purificação de DNA a partir de gel de agarose</i> .....	46
4.10	<i>Sequenciamento de DNA</i> .....	46
4.11	<i>Digestão com endonucleases de restrição</i> .....	47
4.12	<i>Ligação de DNA ao vetor de expressão</i> .....	47
4.13	<i>Construção do cassete de expressão quimérico</i> .....	47
4.14	<i>Expressão em E. coli da TsQ3</i> .....	50
4.15	<i>Lise celular para purificação da Ts3 recombinante</i> .....	50
4.16	<i>Purificação da TsQ3 recombinante</i> .....	50
4.17	<i>Eletroforese SDS-PAGE</i> .....	51
4.18	<i>Dosagem de proteínas por Lowry</i> .....	52
4.19	<i>Teste de toxicidade da proteína quimérica</i> .....	52
4.20	<i>Imunização dos Coelhos</i> .....	52
4.21	<i>ELISA</i> .....	53
4.22	<i>Western Blot</i> .....	54
4.23	<i>Determinação da DL<sub>50</sub></i> .....	54
4.24	<i>Soro neutralização</i> .....	54
4.25	<i>Avaliação da atividade proteolítica de TsP</i> .....	55
4.26	<i>Identificação dos sítios de clivagem das proteases da peçonha</i> .....	55
4.27	<i>RNA-Seq da glândula de peçonha</i> .....	56
4.27.1	<i>Extração de RNA da glândula de peçonha</i> .....	56
4.27.2	<i>Construção da biblioteca para sequenciamento</i> .....	57
4.27.3	<i>Sequenciamento de nova geração - MiSeq-Illumina</i> .....	58
4.27.4	<i>Trimagem das reads</i> .....	58
4.27.5	<i>Montagem dos contigs</i> .....	60
4.27.6	<i>Identificação dos contigs com similaridade a proteases</i> .....	61
4.27.7	<i>Classificação das proteases da glândula de peçonha</i> .....	62
4.27.8	<i>Identificação de domínios e similaridade</i> .....	62
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
5.1	<i>Extração de peçonha de T. serrulatus</i> .....	63
5.2	<i>Construção do cassete de expressão quimérico</i> .....	63
5.2.1	<i>PCR para inserção de adaptadores</i> .....	63
5.3	<i>Clonagem de Ts3, Ts1 e TsNTxP no vetor pGEM-T-Easy</i> .....	64
5.4	<i>Sequenciamento da clonagem das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP no vetor pGEM-T-Easy</i> .....	65
5.5	<i>Construção do vetor de expressão pET26-TsQ3</i> .....	66
5.5.1	<i>Construção do vetor de expressão pET26-Ts3</i> .....	66
5.5.2	<i>Construção do vetor de expressão pET26-Ts3-Ts1</i> .....	66
5.5.3	<i>Construção do vetor de expressão pET26-TsQ3</i> .....	67

5.6	<i>Expressão e purificação da TsQ3</i> .....	68
5.7	<i>Teste de toxicidade da proteína quimérica</i> .....	70
5.8	<i>ELISA</i> .....	70
5.9	<i>Western Blot</i> .....	73
5.10	<i>Soro-neutralização</i> .....	73
5.11	<i>Avaliação da atividade proteolítica de TsP</i> .....	74
5.12	<i>Identificação dos sítios de clivagem das proteases de TsP</i> .....	75
5.13	<i>RNA-Seq da glândula de peçonha</i> .....	77
5.13.1	<i>Extração do RNA da glândula de peçonha</i> .....	77
5.13.2	<i>Construção da biblioteca e sequenciamento de nova geração</i> .....	78
5.13.3	<i>Trimagem das sequências</i> .....	79
5.13.4	<i>Montagem dos contigs</i> .....	80
5.13.5	<i>Identificação dos contigs com similaridades a proteases</i> .....	81
5.13.6	<i>Identificação de domínios e similaridade</i> .....	83
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>87</b>
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>97</b>
7.1	<i>Perspectivas</i> .....	98
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>99</b>
<b>ANEXOS I</b> .....		<b>119</b>
	<i>Mapas dos vetores utilizados</i> .....	119
<b>ANEXOS II</b> .....		<b>121</b>
	<i>Sequências proteicas da quimera e das proteases em fasta com indicação dos domínios</i> .....	121
<b>ANEXOS III</b> .....		<b>124</b>
	<i>Artigos completos publicados durante o período de doutorado</i> .....	124

## Índice de Ilustrações

Figura 1: Representações egípcias de escorpiões. ....	17
Figura 2: Representação esquemática dos tipos de epítomos. ....	29
Figura 3: Morfologia de escorpiões e <i>Tityus serrulatus</i> (Escorpião amarelo). ....	32
Figura 4: Distribuição geográfica de <i>T. serrulatus</i> no território brasileiro. ....	33
Figura 5: Esquema ilustrativo da construção do cassete de expressão TsQ3. ....	49
Figura 6: Concentração de peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> obtida de extrações sucessivas. ....	63
Figura 7: PCR para amplificação das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP. ....	64
Figura 8: PCR de colônia dos clones obtidos após transformação da ligação das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP em pGEM-T-Easy. ....	65
Figura 9: PCR de colônia para a confirmação da ligação entre pET26b e Ts3. ....	66
Figura 10: PCR de colônia para a confirmação da ligação entre pET26-Ts3 e Ts1. ....	67
Figura 11: PCR de colônia para a confirmação da ligação entre pET26-Ts3-Ts1 e TsNTxP. ....	68
Figura 12: Expressão da TsQ3 em BL21 (DE3). ....	69
Figura 13: Purificação da TsQ3 em resina de níquel His-Link. ....	69
Figura 14: Titulação dos soros produzidos contra TsP e TsQ3. ....	71
Figura 15: Reatividade dos soros $\alpha$ -TsQ3, $\alpha$ -TsP, $\alpha$ -TsQ3/TsP e $\alpha$ -TsP/TsQ3 contra TsQ3 (A) e TsP (B) em relação as doses de imunização. ....	72
Figura 16: Western Blot com os soros imunes produzidos. ....	73
Figura 17: Ensaio de clivagem do fibrinogênio por TsP. ....	75
Figura 18: Sítios primários e secundários de clivagem pelas proteases de TsP. ....	77
Figura 19: Gel de agarose 2 % das amostras de RNA da glândula de peçonha de <i>T. serrulatus</i> . ....	78
Figura 20: Valores de qualidade Q de Phred por base ao longo das reads. ....	80
Figura 21: Alinhamento entre as sequências proteicas das TsMS 1-9. ....	84
Figura 22: Arvore filogenética com as sequências das proteases presentes da peçonha de <i>T. serrulatus</i> . ....	86
Figura 23: Mapa do vetor pGEM-T-Easy com seu MCS em evidencia. ....	119
Figura 24: Mapa do vetor pET26b com seu MCS em evidencia. ....	120

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Acidentes escorpionicos no Brasil em 2013 por estado. ....	34
Tabela 2: Número de acidentes e óbitos por animais peçonhentos no ano de 2013. ....	35
Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados para o sequenciamento ....	46
Tabela 4: Reação de ligação de DNA aos vetores de expressão.....	47
Tabela 5: Esquema de um ciclo de imunização das coelhas, com intervalos de 15 dias entre as doses .....	53
Tabela 6: Soro neutralização com os soros imunes produzidos. Sobrevivência (n/%) por grupo.....	74
Tabela 7: Concentração e grau de pureza do RNA extraído.....	78
Tabela 8: Reads geradas pelo sequenciamento antes e após trimagem por tamanho e qualidade.....	79
Tabela 9: Identificação das proteases presentes na peçonha e numero de acesso ao GenBank. ....	82
Tabela 10: Ponto isoelétrico e massa molecular das proteases da peçonha de <i>T. serrulatus</i> . ....	86

## Lista de abreviaturas

$\alpha$ -TsP	Soro anti-TsP
$\alpha$ -TsQ3	Soro anti-TsQ3
°C	Graus Celsius
Amp	Ampicilina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovino
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato
OD	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
IMAC	Cromatografia de afinidade por íon imobilizado
IPTG	Isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo
kb	Quilobase
kDa	Quilo Dalton
LacZ	Gene que codifica a $\beta$ -galactosidase
LB	Meio de Cultura Luria-Bertani
M	Molar
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
mM	Mili-Molar
mg	Mili-grama
mL	Mililitro
$\mu$ F	MicroFaraday
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal
ng	Nanograma
$\Omega$	Ohms
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
ORF	Open reading frame (fase de leitura aberta)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogenionte
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	Tampão salina fosfato Tween 20
PMSF	<i>Phenilmetilsulfonil fluoride</i>
PSA	Persulfato de Amônia
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS

Swiss prot	Protein knowledgebase of Swiss Institute
T4 DNA ligase	DNA ligase do bacteriófago
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq	DNA polimerase termoestável do <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris e EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TEMED	Tetrametiletenodiamino
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano e ácido clorídrico
TsNTxP	<i>Tityus serrulatus non-toxic protein</i>
Ts1	Toxina principal $\beta$ -toxina do veneno de <i>T. serrulatus</i>
Ts2	Toxina $\alpha$ -toxina do veneno de <i>T. serrulatus</i>
Ts3	Principal $\alpha$ -toxina do veneno de <i>T. serrulatus</i>
U	Unidade de enzima
U.V.	Ultra Violeta
V	Volts
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## Resumo

Acidentes causados por picadas de escorpiões representam um sério problema de saúde pública e é considerado negligenciado. O tratamento de acidentes graves e moderados envolve o uso da soroterapia. Para prover uma melhora na qualidade e na produção desse soro, vários pesquisadores estudam o uso de antígenos alternativos para a produção de soro antiescorpiônico. Desta maneira, esse trabalho buscou a produção de uma proteína quimérica recombinante, com base em três toxinas presentes na peçonha de *Tityus serrulatus* (TsP) para a produção de soro antiescorpiônico e a caracterização de novos componentes da peçonha com capacidade de gerar anticorpos neutralizantes. A quimera Tsq3, constituída pelas proteínas Ts1, Ts3 e TsNTxP foi utilizada como imunógeno. Foram imunizados 4 grupos com 2 coelhas com combinações de TsQ3 e TsP. Os soros obtidos possuem a capacidade de reconhecimento mútuo aos dois antígenos, no entanto, os soros produzidos com a TsQ3 apresentaram capacidade de neutralização inferior à do soro produzido contra a TsP. Esse fato pode ser devido à ausência de outras sequências de referência ou de epítomos conformacionais das principais toxinas. Recentemente, Horta *et al.* (2014) demonstraram a importância da utilização de hialuronidase na produção de soro antiescorpiônico. Essa informação nos incentivou a estudar sobre a importância de proteases na produção de soros neutralizantes. Com o auxílio do transcriptoma da glândula de peçonha de *T. serrulatus*, foi possível à identificação de 12 sequências relativas a proteases. Foram identificadas 11 proteases pertencentes à classe das metaloproteases, nomeadas de Metalloserrulases (TsMS 1-11) e uma serino protease nomeada de TsSP 1. Todas as TsMS's possuem peptídeo sinal e propeptídeo. No entanto, não foi encontrada a sequência completa da TsSP 1. Verificando-se que a atividade proteolítica dessa peçonha tem preferência por sítios compostos por aminoácidos básicos. Apesar de essas enzimas serem pouco estudadas na peçonha escorpiônica, elas podem ter um grande potencial como novo alvo para a produção de um soro antiescorpiônico mais eficaz.

**Palavras chave:** Escorpião; *Tityus serrulatus*; proteína quimera; protease; TsMS; TsSP, soro, anti-veneno, anticorpo.

## Abstract

Accidents caused by scorpion stings are a serious public health problem being considered neglected. Treatment of moderate and serious accidents involves the use of antivenom. To provide an improvement in the quality and production of this serum, many researchers have been studying the use of alternative antigens for the production of anti-scorpion serum. Thus this study aimed to produce a recombinant chimeric protein, based on three toxins present in the *Tityus serrulatus* venom (TsP) for producing anti-scorpion serum and characterization of novel components of the venom capable of generating neutralizing antibodies. The TsQ3 chimera, composed by Ts1, Ts3 and TsNTxP proteins was used as immunogen. Four groups of rabbits were immunized with combinations of two antigens, TsQ3 TsP. Sera obtained have a mutual recognition capability to both antigens, however, produced with the sera showed neutralization TsQ3 less than the capacity of the serum raised against the TsP. This may be due to the absence of any reference sequences or conformational epitopes of the major toxins. Recently Horta *et al.* (2014) demonstrated the importance of using hialorunidase on the production of anti-scorpion serum. This information prompted us to study the importance of proteases in the production of neutralizing sera. With the aid of venom gland transcriptome of *T. serrulatus* was possible to identify 12 sequences related to proteases. We identified 11 proteases belonging to the class of metalloproteases, named Metalloserrulases (TsMS 1-11) and a serine protease named TsSP 1. All TSMS's have signal peptide and propeptide, however it was not found the complete sequence of TsSP 1. It was found that the proteolytic activity of this venom has a preference for sites composed of basic amino acids. Although these enzymes are few studies on scorpion venom, they can have a great potential as a novel target for the production of a more effective anti-scorpion serum.

**Key words:** Scorpion; *Tityus serrulatus*; chimeric protein; protease; TsMS; TsSP, serum, anti-venom, antibody.

# 1. Introdução

## 1.1 Escorpiões

Escorpiões inspiram medo devido a sua picada venenosa e por sua aparência. Por outro lado esses animais inspiram grande fascinação pelo seu comportamento ativo e hábitos predatórios. Eram venerados no antigo Egito e considerados sagrados por Isis, a deusa do renascimento (Figura 1). Escorpiões têm adaptações aos ecossistemas terrestres há mais de 425 milhões de anos e representam um dos grupos mais bem adaptados entre os artrópodes terrestres. Eles ocupam quase todos os ambientes, principalmente ecossistemas tropicais e temperados (com exceção das zonas árticas, como Antártica). Independente de divergências genéticas, não apresentam grandes alterações em sua anatomia entre as espécies existentes ao longo do tempo (Beccaloni, 2009).



**Figura 1: Representações egípcias de escorpiões.**

Na figura nota-se a deusa Serket (mais tarde fundida a deusa Isis) com um escorpião em sua cabeça. Ao lado entalhes em pedra de escorpiões juntamente com escrituras egípcias.

O corpo dos escorpiões pode ser dividido em três partes, prossoma (que compreende o cefalotórax, coberto por uma placa única e de onde saem os apêndices locomotores), mesossoma (compreende a maior parte do abdômen) e metassoma (compreende os segmentos do abdômen conhecidos como cauda, onde está localizado o télson). O seu comportamento corresponde basicamente a três padrões ecomorfológicos relacionados ao tipo de substrato: litofílico (habitat em pedras), psamofílico (habitat em areia) e pelofílico (hábitos em solo) (Mebs, 2002; Prendini *et al.*, 2005; Beccaloni, 2009).

De acordo com o *website* (<http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/index.php>), operado por Jan Ove Rein, existem mais de 2.000 espécies de escorpiões que compreendem mais de 195 gêneros e 15 famílias. No entanto, dentre todas as espécies descritas apenas 25 – 30 espécies são consideradas como de importância médica, por causarem acidentes graves (<http://scorpion.amnh.org>; <http://www.who.int/emc/amr.html>; Chippaux & Goyffon, 2008). Com exceção da espécie *Hemiscorpius lepturus*, pertencente à família Hemiscorpiidae, todas as outras espécies de escorpiões perigosas para seres humanos pertencem à família Buthidae (Chippaux & Goyffon, 2008; [http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/h\\_lepturus.htm](http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/h_lepturus.htm)). Os gêneros de escorpiões que merecem maior atenção em vários países, pelo destaque na literatura devido à mortalidade associada a sua peçonha são: *Centruroides* (América do Norte e central), *Tityus* (América do Sul e Central), *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* (África do Norte e Oriente Médio), *Parabuthus* (África do Sul) e *Mesobuthus* (Leste Europeu e Ásia) (Chippaux & Goyffon, 2008; Beccaloni, 2009). No entanto, nem todas as espécies incluídas nos gêneros mencionados acima são perigosas para humanos. Por exemplo, a peçonha do escorpião *Mesobuthus gibbosus*, endêmico da península de Balcãs e Turquia é mais branda do que a peçonha de *M. tumulus*, endêmico da Índia (Beccaloni, 2009).

## 1.2 Escorpionismo

Escorpionismo é uma ameaça à saúde pública que se refere a acidentes associados a picadas de escorpiões e é considerado um sério problema negligenciado de saúde em países em desenvolvimento (WHO, 2007). Os casos de acidentes com picadas de escorpiões com alta severidade são registrados principalmente na América Central e do Sul, Norte da África, Oriente Médio e Sudoeste da Ásia (Chippaux & Goyffon, 2008).

Os principais sintomas associados a picadas de escorpiões são intensa dor local, sudorese, taquicardia, taquipneia, agitação, pancreatite, edema pulmonar, hemólise e necrose

(Espino-Solis *et al.*, 2009; Borchani *et al.*, 2011; Khattabi *et al.*, 2011). A gravidade do envenenamento depende de alguns fatores como massa corpórea, sensibilidade da vítima à peçonha, quantidade de peçonha injetada e a espécie envolvida no acidente.

As picadas de escorpiões representam a segunda fonte primária de envenenamento envolvendo fauna silvestre, ficando atrás apenas dos acidentes ofídicos (Mebs, 2002; Espino-Solis *et al.*, 2009). Em países onde há disponibilidade de uso do soro antipeçonha adequado e outros suportes médicos estão disponíveis, é observado um decréscimo expressivo nas taxas de mortalidade (Chippaux *et al.*, 2011; Chippaux & Goyffon, 2008).

O objetivo do tratamento em casos de escorpionismo é combater os sintomas associados à picada com uso de analgésicos e soroterapia. A eficácia desse tratamento é diretamente relacionada com o tempo decorrido entre a picada e a administração do soro antiescorpiônico. De acordo com o Ministério da Saúde no Brasil, o soro antiescorpiônico só pode ser administrado por médicos capacitados por via intravenosa e em ambiente hospitalar. Os sinais vitais desses pacientes devem ser constantemente monitorados, pois se houver qualquer mudança no padrão clínico é necessária intervenção médica imediata (Ministério da Saúde, 2001).

### 1.3 Epidemiologia do Escorpionismo

#### 1.3.1 Velho Mundo

Entre os países da África do Norte, as maiores taxas de escorpionismo são originadas na Tunísia (420 acidentes por 100.000 habitantes) (Njah *et al.*, 2001) que resultam em cerca de 50 mortes por ano (Mansour, 2001). No entanto dados mais recentes indicam que a Argélia pode ter ultrapassado a Tunísia em acidentes escorpiônicos (Chippaux *et al.*, 2011).

As taxas de acidentes aumentam em todo o continente africano em áreas rurais e comunidades urbanas (Chippaux & Goyffon, 2008). As espécies de escorpiões mais perigosas nesse ponto do velho mundo são: *Androctonus australis*, *A. mauretanicus*, *A. aeneas*, *Leiurus quinquestriatus*, *Buthus occitanus* e *Hottentota franzwernerii*. Porém, na África subsaariana poucos casos de hospitalização e morte são documentados sendo que a maioria registrada é de vítimas jovens, durante o verão (Bergman, 1997; Attamo *et al.*, 2002; Chippaux & Goyffon, 2008).

Sistemas de saúde precários combinados com indisponibilidade ou uso incorreto de soros antipeçonha, nessas localidades resultam em altas taxas de mortalidade (Chippaux *et al.*, 2011). Um padrão de incidência similar à África, mas associados a uma redução significativa nas taxas de mortalidade foi observada após recente melhoria no sistema de saúde no Oriente Médio, por exemplo, na Arábia Saudita (Al-Sadoon & Jarrar, 2003). Porém altas taxas de mortalidade ainda persistem em áreas rurais (Mahaba, 1997). Como os dados epidemiológicos na Índia são esparsos, é difícil estimar o número de acidentes com escorpiões, contudo acidentes fatais são divulgados regularmente (não oficialmente) e são mais observados para a espécie *H. tamulus* (Chippaux & Goyffon, 2008).

### 1.3.2 Novo Mundo

Na América Latina os índices de acidentes escorpiônicos aumentam durante os meses de verão (Schenone & Fontecilla, 1998; de Roodt *et al.*, 2003; Chowell *et al.*, 2005) principalmente em áreas suburbanas (Celis *et al.*, 2007; Schenone & Fontecilla, 1998), envolvendo principalmente adultos (Chowell *et al.*, 2005; Celis *et al.*, 2007). Devido algumas espécies possuírem hábitos urbanos, como *Tityus serrulatus* e *T. trivittatus* muitos desses acidentes ocorrem em domicílios ou áreas peridomiciliares (de Roodt *et al.*, 2003). No México as taxas de acidentes de picadas de escorpiões graves também são influenciadas pela localização, isto é, o escorpionismo é mais comum em áreas urbanas e com população maior do que 2.500 habitantes e são ainda mais comuns em adultos do que em crianças (Chowell *et al.*, 2005; Celis *et al.*, 2007). Outro fator que afeta as taxas de incidência de acidentes é o clima, sendo a maioria das picadas ocorridas no final da estação seca (Chowell *et al.*, 2005). A mortalidade nessas áreas tem diminuído bastante nas últimas décadas devido à disponibilidade de soro antipeçonha contra escorpiões do gênero *Centruroides* (0,6 – 0,7 por 100.000 habitantes) (Celis *et al.*, 2007). Apesar disso, taxas de mortalidade em crianças menores de cinco anos e idosos com mais de 60 anos permanecem altas. Na América do Norte, incluindo o México, escorpiões do gênero *Centruroides* são considerados os mais perigosos, porém para o restante da América Latina escorpiões do gênero *Tityus* representam maior risco para humanos, pois várias espécies se distribuem por grandes áreas incluindo ambientes urbanos, podendo ser endêmicos.

Em vários países acidentes escorpiônicos fatais apresentaram uma queda expressiva durante as últimas décadas. Essa diminuição no número de óbitos está relacionada à

disponibilidade de tratamento e soro antipeçonha específico para diferentes espécies de escorpiões.

No entanto, as taxas de envenenamento fatal variam significativamente entre regiões, mantendo altas taxas de mortalidade em áreas rurais da América Latina. De acordo com de Sousa *et al.* (1996) foram registros 6.803 acidentes com 6,6 mortes por 100.000 habitantes dos Andes. No Brasil *Tityus serrulatus* é a principal espécie causadora de acidentes. Apenas no ano de 2013 foram notificados mais de 77.000 acidentes por escorpiões, destes, mais de 20% ocorrem em Minas Gerais (estado com maior incidência de casos) com uma taxa de mortalidade de 0,09 %. Essa espécie de escorpião é muito bem adaptada a ambientes urbanos e se localiza principalmente nas regiões sudeste e nordeste do Brasil (Cardoso *et al.*, 1995; Freire-Maia & Campos, 1989; Maria *et al.*, 2005; SINAN, 2014).

#### 1.4 Peçonha escorpiônica e toxinas

A peçonha escorpiônica é produzida por um par de glândulas localizadas no télson (último segmento do metassoma) e inoculado por um aguilhão. A peçonha extraída apresenta aspecto mucoso e coloração branca. A maior parte dos componentes é de natureza proteica. No entanto, a peçonha apresenta outras substâncias como muco, sais inorgânicos, lipídeos, aminoácidos, nucleotídeos e aminas biogênicas (Gwee *et al.*, 1996).

O arsenal tóxico dos escorpiões é composto principalmente de neurotoxinas que atuam em canais iônicos (canais para sódio, potássio, cálcio e cloro). Essas neurotoxinas são peptídeos com tamanho variado de 35 - 70 aminoácidos. As toxinas que agem em canais para sódio são consideradas os componentes mais tóxicos da peçonha escorpiônica e apresentam similaridade quanto à sequência primária e à estrutura terciária. Essas toxinas consistem em um arranjo de uma  $\alpha$ -hélice e duas a três folhas- $\beta$ , são ainda estabilizadas por três a quatro pontes dissulfeto (Rodríguez de la Vega & Possani, 2005; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2010; Chugunov *et al.* 2013). As toxinas escorpiônicas que agem em canais iônicos podem ser classificadas com base no tipo de canal de atuação, efeitos farmacológicos e sua sequência primária. No entanto, algumas proteínas de maior massa molecular são encontradas na peçonha, como hialuronidases, proteases e fosfolipases, que também podem contribuir para os sintomas associados com o envenenamento (Alvarenga *et al.*, 2012; Costal-Oliveira *et al.*, 2012; Borchani *et al.*, 2013; Venancio *et al.*, 2013; Horta *et al.*, 2014; Carmo *et al.*, 2014).

As toxinas de canais para sódio podem ser classificadas em  $\alpha$  ou  $\beta$  (e ainda subdivididas nesses grupos) de acordo com seu modo de ação e organismo alvo (Catterall, 1980; Jover *et al.*, 1980; Billen *et al.*, 2008). As  $\alpha$ -toxinas que atuam em canais para sódio se ligam no sítio 3 desse canal e impedem a sua inativação ou retardam esse processo, desencadeando um atraso na transmissão de impulsos nervosos. Essa classe de toxinas também é considerada a mais tóxica da peçonha (Martin-Eauclaire *et al.*, 1994; Arantes *et al.*, 1994; Bosmans & Tytgat, 2007; Chen & Chung-a, 2012; Kalapothakis & Chavez-Olórtegui, 1997). Já as  $\beta$ -toxinas se ligam ao sítio 4 dos canais para sódio dependentes de voltagem, fazendo com que esse canal se abra com menores estímulos, ou seja, menores potenciais de ação, levando à despolarização da membrana. Em resumo, as  $\beta$ -toxinas deixam os canais para sódio mais sensíveis à abertura (Zhang *et al.*, 2012; Chen & Chung-b, 2012; Barhanin *et al.*, 1982; Cestèle *et al.*, 1998; Pedraza Escalona & Possani, 2013).

As toxinas que afetam canais para potássio são mais diversas e têm função de bloquear ou inativar esses canais. Elas podem ser classificadas em  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx,  $\gamma$ -KTx e  $\kappa$ -KTx em relação a sua atividade farmacológica e tipo de canal de ação (Carbone *et al.*, 1982; Possani *et al.*, 1982; Bergeron & Bingham, 2012).

Outras neurotoxinas também vêm sendo descobertas e afetam canais para cloro ou cálcio (Mouhat *et al.*, 2004; Norton & McDonough, 2008). As toxinas que agem em canais para cloro atuam principalmente bloqueando esse tipo de canal (Tytgat *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2000a; Zhijian *et al.*, 2006), já as toxinas que agem em canais para cálcio são bastante heterogêneas em relação à sequência primária e tamanho e atuam principalmente no bloqueio desses canais (Valdivia & Possani, 1998; Chuang *et al.*, 1998; Fajloun *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001; Norton & McDonough, 2008).

Além das neurotoxinas, a peçonha escorpionica contém enzimas como hialuronidasas, proteases e fosfolipases. As hialuronidasas são capazes de degradar o ácido hialurônico (maior componente da matriz extracelular) e estão associadas com a dispersão da peçonha através dos tecidos (Pessini *et al.*, 2001; Costal-Oliveira *et al.*, 2012; Venâncio *et al.*, 2013, Horta *et al.*, 2014). As proteases são ainda pouco descritas para escorpiões e muitas espécies não apresentam atividade proteolítica detectável (Venâncio *et al.*, 2013; Carmo *et al.*, 2014). No entanto, a peçonha de algumas espécies como *T. serrulatus* pode desenvolver pancreatite em algumas vítimas causada pela protease Antarease (Fletcher *et al.*, 2010). A peçonha de *H. lepturus* é a única descrita que possui atividade dermonecrótica e hemolítica, essa ação é causada pela enzima Heminecrolisina, uma esfingomielinase D (Borchani *et al.*, 2011a;

Borchani *et al.*, 2011b). A ação sinérgica de várias toxinas presentes na peçonha é a responsável pelos diversos efeitos tóxicos resultantes do escorpionismo.

### 1.5 Soro antipeçonha escorpiônico

O soro antipeçonha escorpiônico ou soro antiescorpiônico é produzido pela imunização de cavalos seguido do isolamento dos anticorpos imunoglobulinas G (IgG). Os anticorpos específicos contra a peçonha são purificados a partir do soro e em seguida digeridos, os fragmentos Fab' ou F(ab')<sub>2</sub> gerados são purificados para a utilização clínica. O soro produzido na Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, MG – Brasil), específico para *T. serrulatus*, é capaz de neutralizar 1 mg de peçonha por mL de soro. A administração do soro específico tem a função de neutralizar a peçonha circulante e pode ser usado apenas em hospitais com equipe médica treinada. Com base na classificação do grau do acidente o paciente pode receber mais de 6 ampolas de soro (contendo 5 mL) (Rezende *et al.*, 1995).

Uma alternativa para os soros antipeçonha comerciais é o uso de soro liofilizado em regiões tropicais e/ou pobres. O soro antipeçonha liofilizado tem uma grande vantagem para a preservação em longo prazo e pode ainda ser armazenado em temperatura ambiente. No entanto, essa antipeçonha pode ter problemas para a ressuspensão, pois sua solubilidade depende diretamente da qualidade do processo de liofilização (Theakston *et al.*, 2003).

### 1.6 Historia da produção de soro antiescorpiônico em cavalos

O primeiro soro antiescorpiônico produzido pela imunização de cavalos foi produzido por Todd em 1909 com a peçonha do escorpião *Buthus quinquestriatus* endêmico do Egito. A peçonha era extraída pela maceração do telson dos escorpiões, ressuspensa em solução salina, centrifugada e o sobrenadante utilizado para a imunização dos cavalos. Os animais imunizados apresentavam vários sintomas de envenenamento, incluindo dor no local da injeção, diarreia, salivação, sudorese e tetania. A peçonha ainda era misturada a iodo antes de ser inoculada para minimizar os sintomas (Todd, 1909). Maurano (1915) desenvolveu o primeiro soro antiescorpiônico brasileiro contra a peçonha de *T. bahiensis* utilizando o mesmo protocolo que Todd (1909), no entanto o soro produzido apresentou baixa capacidade de neutralização. Em 1917 foi produzido o primeiro soro antiescorpiônico brasileiro com capacidade de proteção efetiva. Esse soro foi desenvolvido por Vilela (1917) contra a peçonha

de *T. serrulatus*, que naquela época, acreditava ser uma variação mais clara de *T. bahiensis*, contudo já se sabia que a toxicidade de sua peçonha era maior. Apenas em 1918 a produção de soro antiescorpiônico contra *Tityus sp.* foi conduzida em larga escala (Lucas, 2003). A primeira geração de soros anti-peçonha continha apenas o plasma sanguíneo sem os componentes celulares do sangue. No ano de 1927, as imunoglobulinas começaram a ser purificadas a partir do plasma equino para uso em humanos. Essas preparações contendo anticorpos purificados apresentaram menor quantidade de contaminantes (proteínas plasmáticas presentes no soro), dessa maneira, efeitos adversos decorrentes da soroterapia foram prevenidos. Para a eliminação dos sintomas associados à soroterapia, os anticorpos purificados começaram a ser tratados com pepsina, que cliva os anticorpos gerando o fragmento Fab' que é capaz de neutralizar a peçonha, minimizando ainda mais os efeitos adversos (Espino-Solis *et al.*, 2009).

Com o uso dessa tecnologia a produção de soro anti-peçonha foi aprimorada em todo o mundo. Em adição aos protocolos clássicos, que utilizam peçonha bruta como antígeno, novas tecnologias utilizando a peçonha detoxificada, toxinas recombinantes ou peptídeos sintéticos têm sido desenvolvidos para melhorar ainda mais a eficácia do soro anti-peçonha. Entretanto, pelo que conhecemos, até a presente data nenhuma dessas técnicas de imunização foi utilizada na produção comercial de soro antiescorpiônico.

## **1.7 Formas alternativas de produção de soro antiescorpiônico**

### **1.7.1 Imunização com peçonha detoxificada**

A detoxificação é descrita como um processo de desenvolvimento de soro antiescorpiônico utilizando imunógeno atenuado. A detoxificação da peçonha é realizada antes da imunização com o objetivo de atenuar os efeitos tóxicos da peçonha e com isso manter a saúde animal, com o aumento de sua expectativa de vida e redução do sofrimento causado pela sucessiva imunização com peçonha bruta.

Vários agentes foram utilizados para se obter a detoxificação das peçonhas escorpiônicas. Alguns agentes químicos alcançaram significativa capacidade de redução de toxicidade sem afetar a capacidade de produção de anticorpos neutralizantes. Abbadi & Irunberry (1970) adicionaram azul de metileno a peçonha para a detoxificação. Outros agentes químicos como glutaraldeído, formaldeído e iodo também foram utilizados com sucesso

(Possani *et al.* 1981; Heneine *et al.* 1986; Das Gupta *et al.* 1989; Kharrat *al.*, 1997; Heneine & Heneine, 1998; Kaabi *et al.* 2001; Machado de Avila *et al.* 2004). Esses agentes são capazes de diminuir o valor da DL<sub>50</sub> de 6-30 vezes em relação à peçonha bruta. Além de promover a produção de anticorpos. Algumas peçonhas detoxificadas também desenvolveram proteção vacinal contra a peçonha bruta (Possani *et al.*, 1981; Heneine *et al.*, 1986; Kharrat *et al.*, 1997; Kaabi *et al.*, 2001; Machado de Ávila *et al.*, 2004). O uso de radiação Gama na peçonha em presença de água também é capaz de levar uma alta diminuição da toxicidade da peçonha, cerca de 25 vezes o valor da DL<sub>50</sub> da peçonha não tratada (Abib & Laraba-Djebari, 2003; Lila & Laraba-Djebari, 2011).

Outra alternativa que resulta na diminuição de toxicidade são os lipossomas. Esses lipídios encapsulam a peçonha diminuindo assim sua toxicidade. No entanto, os soros gerados com essa metodologia não apresentaram capacidade neutralizante equivalente ao soro produzido de maneira convencional, necessitando de mais estudos (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1991; Fonseca *et al.*, 1997).

### **1.7.2 Imunização com frações tóxicas da peçonha**

A maior parte da toxicidade da peçonha escorpionica é atribuída a neuropeptídios com massa molecular entre 1,5 e 8 kDa. Devido a grande quantidade de componentes na peçonha, muitos são capazes de induzir grande produção de anticorpos sem serem tóxicos, enquanto que algumas neurotoxinas não têm capacidade imunogênica elevada, e ainda algumas toxinas tem capacidade de imunossupressão (Shah *et al.*, 2003; Varga *et al.*, 2012). Assim, o uso de frações tóxicas da peçonha direciona mais a produção de anticorpos contra os componentes considerados mais importantes para a proteção do soro.

Portanto, alguns estudos que utilizaram essa fração, adotaram metodologias de detoxificação para conseguirem inocular maior quantidade. Garcia y Perez *et al.* (1988) conseguiram gerar soro de coelho contra a fração tóxica detoxificada de peçonhas de várias espécies do gênero *Centruroides*. No entanto, o soro não obteve boa capacidade de neutralização quando comparada ao soro gerado contra a fração não detoxificada.

### 1.7.3 Imunização com anatoxinas nativas

As toxinas de escorpiões comumente apresentam sequências e estrutura similares (Chugunov *et al.*, 2013). No entanto, alguns peptídeos chamados de anatoxinas possuem alta similaridade as toxinas sem exibir efeitos tóxicos a mamíferos. Porém, essas anatoxinas podem apresentar efeitos em outros organismos ou tecidos que não são tipicamente estudados.

Existem três trabalhos que utilizaram anatoxinas e foram capazes de gerar soro neutralizante contra a peçonha bruta ou contra toxinas purificadas. O soro de coelho produzido contra a TsNTxP é capaz de neutralizar 20 DL<sub>50</sub> por mL da peçonha de *T. serrulatus* (Chavez-Olórtegui *et al.*, 1997). Já o soro de coelho contra a anatoxina Amm8 de *A. mauretanicus* é capaz de neutralizar 42 DL<sub>50</sub> por mL de soro da toxina AaH2 de *A. australis* (Martin-Eauclaire *et al.*, 2006). A imunização com as anatoxinas KAaH1 e KaH2 de *A. australis* foi capaz de gerar proteção vacinal contra a toxina AaH2 e a fração tóxica da peçonha de *A. australis* (Srairi-Abid *et al.*, 2008). Assim, as anatoxinas representam uma fonte interessante de antígenos para a produção de soro antiescorpiônico sem causar danos à saúde dos animais produtores.

### 1.7.4 Imunização com toxinas recombinantes

As neurotoxinas possuem similaridades em sua sequência primária, estrutura terciária e no padrão de pontes dissulfeto. Por isso, o soro gerado contra uma (ou algumas toxinas) pode gerar anticorpos que tenham reconhecimento cruzado e capacidade de neutralizar outros componentes tóxicos. Além disso, algumas toxinas podem representar uma grande proporção da peçonha (ex. a  $\beta$ -toxina Ts1 corresponde a 15% da peçonha de *T. serrulatus*) (Cologna *et al.*, 2009), enquanto outras toxinas podem representar uma porcentagem muito baixa na peçonha bruta, limitando o seu uso na produção de soro anti-peçonha. Uma opção que substitui a purificação de toxinas pouco representadas na peçonha é a expressão de toxinas recombinantes utilizando sistemas de expressão baseados em *Escherichia coli*. Esses sistemas de expressão são muito bem caracterizados e podem gerar grandes quantidades de proteína recombinante.

As primeiras toxinas escorpiônicas produzidas de maneira recombinante para a imunização de animais foram expressas como uma proteína de fusão para o aumento de sua solubilidade e facilidade para a purificação. Bouhaouala-Zahar *et al.* (1996) expressaram a  $\alpha$ -toxina BotXIV de *B. occitanus tunetanus* fusionada a dois domínios Z em *tandem* (o domínio

Z é o domínio de ligação da proteína A de *Staphylococcus aureus*). Essa toxina recombinante é capaz de causar paralisia em insetos, porém não tem efeitos em mamíferos. No entanto, o soro produzido em coelhos contra essa toxina recombinante foi capaz de neutralizar 20 DL<sub>50</sub> por mL de soro contra a fração tóxica (G50) da peçonha desse escorpião. Além disso, as imunizações utilizando a proteína recombinante conferiram proteção vacinal contra o desafio com a fração tóxica. Seguindo a estratégia anterior, Benkhadir *et al.* (2002) expressaram a toxina Bot-III. O soro de camundongo produzido era capaz de neutralizar 10 DL<sub>50</sub> de peçonha por mL de soro. Guatimosim *et al.* (2000) expressou a anatoxina de *T. serrulatus* TsNTxP fusionada com a proteína de ligação a maltose (MBP), o soro de coelho produzido contra ela é capaz de neutralizar 20 DL<sub>50</sub> por mL da peçonha bruta. Legros *et al.* (2001) expressaram três toxinas de *A. australis* (AaH1, AaH2 e AaH3) fusionadas a MBP, juntas essas toxinas promoveram a produção de um soro em coelho capaz de neutralizar 15 DL<sub>50</sub> por mL contra a fração tóxica da peçonha. Essas toxinas também foram capazes de gerar proteção vacinal. Garcia *et al.* (2003) expressaram a toxina com ação em crustáceos Cn5 de *C. noxius*, porém não foram capazes de gerar anticorpos neutralizantes em coelhos ou proteção vacinal contra a toxina Cn2 nativa.

Sistemas de expressão bacteriana podem produzir proteínas recombinantes em corpos de inclusão insolúveis. No entanto, Mendes *et al.*, (2008) mostraram que esses corpos de inclusão também podem ser imunogênicos. Especificamente, a  $\beta$ -toxina Ts1 (a toxina mais abundante nessa peçonha) foi expressa em corpos de inclusão com 2 cópias em tandem e uma pequena cauda de fusão T7-Tag. Essa recombinante foi capaz de induzir a produção de soro em coelhos com capacidade de neutralizar 15 DL<sub>50</sub> por mL de soro contra a peçonha bruta e 140 DL<sub>50</sub> por mL de soro contra a Ts1 nativa. Além disso, essa recombinante conferiu proteção vacinal contra a peçonha bruta.

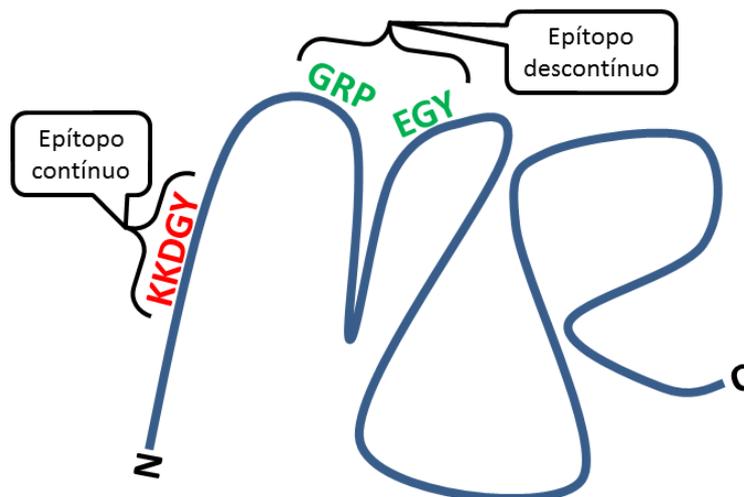
Proteínas recombinantes contendo cauda de seis histidinas (6x-His) vêm sendo utilizadas para a expressão de toxinas. Essa cauda tem alta afinidade por metais como níquel, facilitando sua purificação em resinas de afinidade com metais imobilizados (IMAC). Esse sistema pode ser utilizado com uma grande variedade de tampões e reagentes, o que promove grande plasticidade e bons rendimentos. García-Gómez *et al.* (2009) expressaram a toxina Pg8 da peçonha de *Parabuthus granulatus* fusionada a uma cauda de histidinas. O soro produzido com essa recombinante neutraliza 8 DL<sub>50</sub> por mL de soro contra a toxina nativa e ainda confere proteção vacinal contra a peçonha desse escorpião. Hernández-Salgado *et al.* (2009) expressaram 3 isoformas da toxina Css2 de *C. suffusus*. Duas dessas eram ativas: uma

similar a nativa e outra contendo uma cauda de histidinas, a isoforma inativa possui a mutação E15R. Os soros produzidos em coelhos contra essas 3 isoformas de C<sub>ss</sub>2 produziram anticorpos capazes de neutralizar 15 DL<sub>50</sub> por mL de soro contra a peçonha bruta.

Muitos desses estudos descrevendo o uso de toxinas recombinantes para a geração de soro anti-peçonha demonstraram proteção contra a peçonha bruta. No entanto, ainda é necessária a produção de diferentes toxinas recombinantes da mesma espécie de escorpião para a geração de um soro anti-peçonha que consiga uma proteção mais efetiva contra a peçonha bruta. Uma vantagem do uso dessas toxinas como antígenos é de que proteínas recombinantes costumam não possuir toxicidade devido à ausência de estrutura terciária correspondente a toxina nativa. Sem a toxicidade a imunização com essas proteínas gera menos injúria aos animais. No entanto, o maior problema enfrentado pela utilização dessa técnica é a inabilidade de bactérias formarem pontes dissulfeto corretamente, o que resulta na expressão de toxinas sem a conformação terciária adequada. Sem a correta estrutura terciária, os epítomos descontínuos são modificados, fazendo com que alguns anticorpos gerados contra elas não apresentem capacidade de proteção contra as toxinas nativas ou peçonha bruta.

### **1.7.5 Imunização com peptídeos sintéticos**

Outra ferramenta utilizada como imunógeno para a produção de soro anti-peçonha e o uso de peptídeos sintéticos com sequência baseada nas toxinas escorpiônicas. Esses epítomos são identificados por técnicas de mapeamento de sequências antigênicas, como Phage Display ou SPOT (Gazarian *et al.* 2000; Duarte *et al.*, 2010). A técnica de Phage Display utiliza uma biblioteca de fagos que expressam diferentes peptídeos na superfície do capsídeo (Smith, 1985). Os epítomos imunorreativos são então sequenciados para a aferição de sua sequência. Já a técnica de SPOT utiliza peptídeos sintéticos com base em uma sequência alvo (cerca de 10 – 15 aminoácidos com sobreposição de sequência) que são ligados a uma membrana de celulose. Os peptídeos reativos são definidos pelo uso de soro específico. Após a identificação, esses peptídeos são sintetizados e utilizados como antígenos para a imunização. Os epítomos contínuos são definidos como uma porção linear da sequência primária de uma toxina, já os epítomos descontínuos são compostos por diferentes porções da sequência primária da toxina, porém eles permanecem próximos na conformação terciária (Figura 2). Para aumento da imunogenicidade esses pequenos peptídeos são ligados a proteínas carregadoras como BSA (albumina do soro bovino), OVA (albumina de ovo) ou KLH (*keyhole limpet hemocyanin*).



**Figura 2: Representação esquemática dos tipos de epítomos.**

Na figura, a linha azul representa uma proteína hipotética. As letras vermelhas representam um epítipo contínuo, localizado na sequência linear da proteína. Já as letras verdes representam um epítipo descontínuo, localizado em diferentes porções da sequência linear da proteína. As letras 'N' e 'C' apresentam as extremidades N- e C-terminais da proteína.

Bahraoui *et al.* (1986) produziram o primeiro soro anti-peptídeo com o uso de um peptídeo, ligado a BSA, correspondente aos resíduos 50-59 da toxina AaH2 de *A. australis*. Esse soro foi capaz de neutralizar a toxina nativa, porém não foi testado contra a peçonha bruta ou como proteção vacinal. A partir desse primeiro trabalho, outras pesquisas seguiram a mesma linha imunizando camundongos e coelhos para a produção de soro. Os resultados obtidos são variáveis uma vez que cada trabalho utilizou sequências de diferentes trechos de toxinas. Alguns trabalhos utilizaram peptídeos contínuos e outros descontínuos, sendo que os últimos apresentaram resultados mais satisfatórios (Ait-Amara *et al.*, 1993; Calderon-Aranda *et al.*, 1995; Devaux *et al.*, 1997, Calderon-Aranda *et al.*, 1999; Alvarenga *et al.*, 2002; Inceoglu *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2010).

Esses estudos mostram que é possível a produção de soro anti-peçonha com o uso de epítomos definidos. Alguns desses peptídeos apresentaram boa capacidade neutralizante, no entanto, formulações utilizando múltiplos peptídeos podem ser testadas para a produção de um soro com capacidade neutralizante mais abrangente a outros componentes tóxicos da peçonha.

### 1.7.6 Anticorpos monoclonais contra a peçonha escorpionica

Desde a descoberta dos anticorpos monoclonais (mAb's) por Kohler & Milstein (1975), vários mAb's vêm sendo desenvolvidos para o tratamento de doenças e desenvolvimento de kits de diagnóstico. O primeiro mAb gerado contra uma toxina de escorpião foi produzido por el Ayeb & Roachat (1988) que produziram dois monoclonais

contra a toxina AaH2. Ambos mAb's se ligavam muito bem a essa toxina, contudo um anticorpo possuía capacidade neutralizante e o outro não (Yahi *et al.* 1992). Nem todos os mAb's possuem capacidade neutralizante, pois o sítio de ligação pode ser diferente do sítio ativo da toxina (Bahraoui *et al.*, 1988; Devaux *et al.*, 1997; Clot-Faybesse *et al.*, 1999; Mousli *et al.*, 1999). No entanto alguns mAb's tem a capacidade de reconhecer mais de uma toxina, devido as similaridades entre as sequências de toxinas (entres espécies ou gêneros). Dessa maneira essa reação cruzada seria muito interessante para a neutralização da peçonha escorpiônica (Zamudio *et al.* 1992; Hérion *et al.* 1995; Calderon-Aranda *et al.* 1995; Alvarenga *et al.* 2005). Licea *et al.* (1996) caracterizou um anticorpo monoclonal capaz de neutralizar 43 DL<sub>50</sub> por mg de F(ab')<sub>2</sub> contra a peçonha de *C. noxius*.

Essa metodologia apresenta vantagens na produção direcionada de anticorpos neutralizantes. Devido à especificidade, um mAb pode neutralizar uma ou poucas toxinas, deixando outras ainda ativas. Por isso uma mistura de vários mAb's podem ser necessários para uma neutralização satisfatória. Por outro lado a busca por mAb's humanos pode ser interessante na prevenção de reações alérgicas consequentes da soroterapia, relativamente comuns em acidentes envolvendo serpentes ou aranhas (Lo Vecchio *et al.*, 1999; da Silva *et al.*, 2011). A identificação de novos mAb's pode levar ao desenvolvimento de um soro mais efetivo contra as espécies que representam perigo a humanos. Outros Mab's específicos contra toxinas escorpiônicas tem sido usados para identificar novos epítomos e toxinas (Jia *et al.* 2000; Wu *et al.*, 2001; Devaux *et al.*, 2002; Hernández *et al.* 2002).

### **1.7.7 Anticorpos recombinantes baseados em anti-peçonha escorpiônica**

A fusão de duas metodologias levou a produção de anticorpos recombinantes. Esses anticorpos já são utilizados como sondas, para diagnósticos e terapia (Frenzel *et al.* 2013). Vários sistemas de expressão podem ser utilizados, o que resulta em um alto rendimento de proteínas recombinantes comparado ao tradicional sistema de produção de monoclonais em cultura de células. Além disso, esses anticorpos gerados por manipulação do DNA podem conter varias modificações, incluindo geração de anticorpos quiméricos (porção leve e pesada de organismos diferentes). Anticorpos recombinantes podem ser gerados com base em culturas de mAb's seguido do isolamento do cDNA específico da porção de reconhecimento do antígeno e posteriormente clonada no vetor de interesse.

Os primeiros trabalhos utilizando essa metodologia apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que os anticorpos gerados apresentaram características similares aos mAb's dos quais foram baseados (Mousli *et al.*, 1999, Selisko *et al.*, 2004). Porém, a clonagem apenas da porção Fab' por Aubrey *et al.* (2004) não apresentou a mesma eficácia que o mAb de origem.

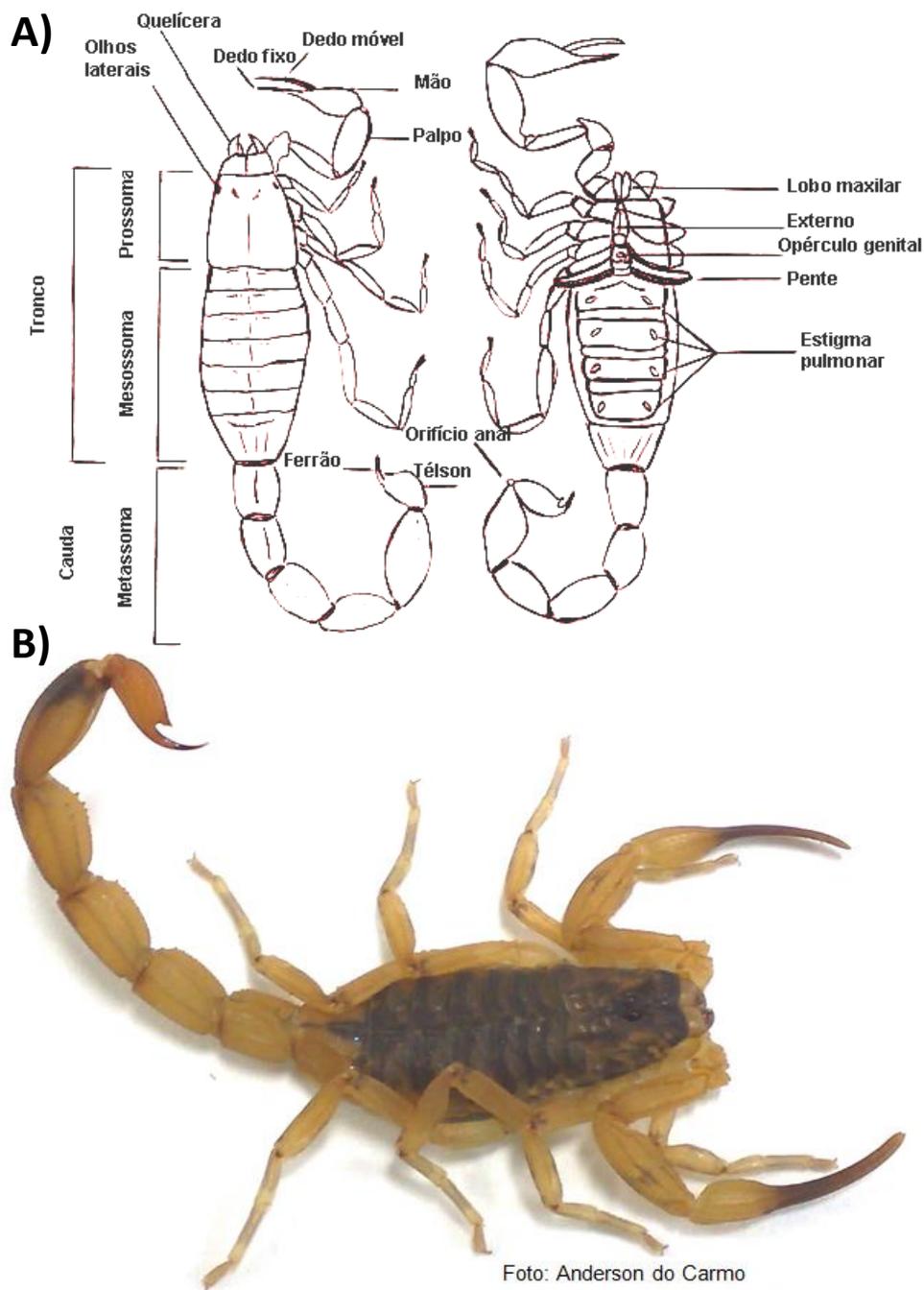
Experimentos utilizando mutagênese na sequência de reconhecimento de anticorpos são interessantes para a geração de novos anticorpos recombinantes mais generalistas (reconhecendo mais de uma toxina da peçonha) e mais estáveis (Juárez-González *et al.*, 2005; Juste *et al.*, 2007; Di Tommaso *et al.*, 2012). Outro aspecto interessante nessa metodologia é a geração de anticorpos humanizados, que podem ser desenvolvidos como quiméras. A capacidade de neutralização desses recombinantes já foi descrita por vários autores (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005; Riaño-Umbarila *et al.*, 2011; Amaro *et al.*, 2011; Pucca *et al.*, 2012; Quintero-Hernández *et al.*, 2012).

O avanço mais recente nessa área foi o uso dos *nanobodies* que são anticorpos de menor tamanho encontrados em tubarões e camelídeos. Nanobodies são expressos como uma cadeia única, sendo que sua porção de reconhecimento ao antígeno chamada de VHH e possui tamanho de 12-15 kDa. Devido ao tamanho reduzido essas moléculas podem se ligar a epítomos indisponíveis a anticorpos convencionais. Além disso, essas moléculas são muito estáveis, podem ser expressas de forma recombinante, e tem capacidade de neutralização semelhante aos anticorpos convencionais. Em comparação, com a porção Fab' de um IgG equino é 3 vezes maior que o domínio VHH dos nanobodies, portanto sua farmacocinética é mais efetiva. Assim essas moléculas já foram descritas na rápida neutralização de toxinas escorpiônicas (Hmila *et al.*, 2008; Abderrazek *et al.*, 2009; Hmila *et al.*, 2010; Abderrazek *et al.*, 2011; Ezzine *et al.*, 2012; Hmila *et al.*, 2012). A vantagem do uso de anticorpos recombinantes está diretamente ligada ao grande rendimento de produção em sistemas heterólogos.

## 1.8 *Tityus serrulatus*

Há no território brasileiro várias espécies de escorpiões, porém apenas o gênero *Tityus* possui representantes que podem causar acidentes graves a seres humanos (Soares *et al.*, 2002). Dentre as espécies pertencentes a esse gênero, *T. serrulatus* (escorpião amarelo, Figura

3) destaca-se pela grande população, reprodução por partenogênese, maior toxicidade da peçonha e alta adaptabilidade a ambientes urbanos (Lourenço & Cloudsley-Thompson, 1999).



**Figura 3: Morfologia de escorpiões e *Tityus serrulatus* (Escorpião amarelo).**

Esquema ilustrativo da morfologia dos escorpiões e foto ilustrativa da região dorsal de um exemplar de *T. serrulatus*. Em A) Vista dorsal e ventral do escorpião. O prossoma compreende o cefalotorax e apêndices e o opistosoma compreende o mesossoma e metassoma. O par de glândulas de peçonha se localiza no último segmento do metassoma, télson, onde também está presente um aguilhão para a inoculação da peçonha. Desenho de Guarnieri (1998) adaptado. Em B) é possível notar a coloração marrom no dorso e amarela nas patas, palpos e metassoma.

O ambiente urbano é um dos nichos preferidos por essa espécie, uma vez que as populações de *T. serrulatus* encontram-se concentradas em cidades (Torres *et al.*, 2002;

Bortoluzzi *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2009). Esse tipo de ambiente abriga grande quantidade de presas, como baratas dentre outros insetos, nas redes de esgotos, de energia e nos cemitérios. O escorpião *T. serrulatus* se encontra amplamente distribuído pelo Brasil, nas regiões sudeste, nordeste, centro oeste e em parte da região sul, como demonstrado no mapa (Figura 4).



**Figura 4: Distribuição geográfica de *T. serrulatus* no território brasileiro.**

Ampla distribuição de *T. serrulatus* pelo território brasileiro nas regiões sudeste, nordeste, centro-oeste e em parte da região sul. As maiores populações dessa espécie estão localizadas principalmente nos centros urbanos. Adaptado de Borges *et al.* (2010)

### 1.8.1 Epidemiologia de *T. serrulatus*

Os escorpiões são responsáveis pela maior parte dos acidentes envolvendo animais peçonhentos (Tabela 1) no Brasil. Esses acidentes representam 52% de todos os registros dessa natureza, incluindo serpentes, aranhas e outros animais peçonhentos (Tabela 2) (SINAN, 2014).

Acidentes com escorpiões podem ter alta gravidade e culminar em óbito, isso dependerá da gravidade do envenenamento. Com base nos dados supracitados, acidentes com escorpiões são responsáveis por quase 32% dos óbitos decorrentes de acidentes com animais peçonhentos, demonstrando a grande importância dos quadros de escorpionismo no Brasil (Academia Brasileira de Ciências, 2010; SINAN, 2014).

Tabela 1: Acidentes escorpiônicos no Brasil em 2013 por estado.

UF Notificação	Acidente		Óbitos	
	Número	%	Número	%
<b>Norte</b>	3.502	4,51	1	1,33
Rondônia	172	0,22	-	-
Acre	174	0,22	-	-
Amazonas	380	0,49	-	-
Roraima	61	0,08	-	-
Para	1.885	2,43	1	1,33
Amapá	128	0,16	-	-
Tocantins	702	0,90	-	-
<b>Nordeste</b>	38.199	49,18	44	58,67
Maranhão	716	0,92	-	-
Piauí	1.809	2,33	5	6,67
Ceara	3.390	4,36	1	1,33
Rio Grande do Norte	3.293	4,24	-	-
Paraíba	2.848	3,67	-	-
Pernambuco	7.940	10,22	7	9,33
Alagoas	6.790	8,74	4	5,33
Sergipe	898	1,16	-	-
Bahia	10.515	13,54	27	36,00
<b>Sudeste</b>	30.658	39,47	19	25,33
Minas Gerais	16.938	21,81	10	13,33
Espirito Santo	2.208	2,84	3	4,00
Rio de Janeiro	289	0,37	1	1,33
São Paulo	11.223	14,45	5	6,67
<b>Sul</b>	1.644	2,12	-	-
Paraná	1.215	1,56	-	-
Santa Catarina	216	0,28	-	-
Rio Grande do Sul	213	0,27	-	-
<b>Centro-Oeste</b>	3.663	4,72	11	14,67
Mato Grosso do Sul	870	1,12	2	2,67
Mato Grosso	876	1,13	2	2,67
Goiás	1.409	1,81	5	6,67
Distrito Federal	508	0,65	2	2,67
<b>Total</b>	77.666	100	75	100

Fonte: SINAN, 2014.

A maior parte dos acidentes escorpiônicos ocorre nos meses quentes e chuvosos, período em que os escorpiões apresentam maior atividade (Ministério da Saúde, 2009; SINAN, 2014). A picada, na maior parte dos casos, atinge os membros superiores, como as mãos e os antebraços. Dados obtidos no Brasil entre os anos de 2007 e 2012 mostram que os indivíduos com idade inferior a 10 anos apresentam maior sensibilidade à peçonha e propensão ao falecimento, contribuindo com a maior parte do total de óbitos. Dessa forma, as crianças necessitam de maior atenção das autoridades e cuidado nos centros de saúde durante o tratamento do escorpionismo (Ministério da Saúde, 2001; SINAN, 2014). Além da idade do indivíduo acidentado, outros fatores como a espécie do escorpião envolvido, sensibilidade da

vítima à peçonha e quantidade de peçonha injetada na vítima são decisivos no desencadeamento dos sintomas do escorpionismo (Hering *et al.*, 1992; Cupo *et al.*, 1994; Ministério da Saúde, 2001, 2009).

**Tabela 2: Número de acidentes e óbitos por animais peçonhentos no ano de 2013.**

<b>Tipo de Acidente</b>	<b>Acidente</b>		<b>Óbitos</b>	
	<b>Número</b>	<b>%</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Escorpião</b>	77.666	52,44	75	31,78
<b>Serpente</b>	26.967	18,21	103	43,64
<b>Aranha</b>	29.167	19,70	18	7,63
<b>Lagarta</b>	3.691	2,49	2	0,85
<b>Abelha</b>	10.600	7,16	38	16,10
<b>Total</b>	<b>148.091</b>	<b>100</b>	<b>236</b>	<b>100</b>

Fonte: SINAN, 2014.

### 1.8.2 Toxinas de *T. serrulatus*

A peçonha do escorpião *T. serrulatus* é uma mistura complexa de substâncias. Os peptídeos com massa molecular entre 4 e 8 kDa representam as principais toxinas da peçonha (Barhanin *et al.*, 1982; Possani *et al.*, 1992; Mansuelle *et al.*, 1992; Martin-Eauclaire *et al.*, 1994; Arantes *et al.*, 1994; Corona *et al.*, 1996; Pessini *et al.*, 2001; Cologna *et al.*, 2009; Fletcher *et al.*, 2010). Além das toxinas (peptídeos de baixa massa molecular), a peçonha de *Tityus serrulatus* é composta por uma grande variedade de substâncias químicas, como muco, sais inorgânicos, proteínas de alta massa como hialuronidases, proteases, peptídeos hipotensores, nucleotídeos, lipídeos e aminoácidos (Gwee *et al.*, 1996; Fukuhara *et al.*, 2003; Cologna *et al.*, 2009; Verano-Braga *et al.*, 2008, 2010; Alvarenga *et al.*, 2012, Horta *et al.*, 2014; Carmo *et al.*, 2014).

As principais toxinas da peçonha atuam em canais iônicos para sódio dependentes de voltagem (Becerril *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Cologna *et al.*, 2009). A partir da análise da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus*, foi observado que as toxinas que atuam nos canais para sódio representam 16% das EST's relacionadas à peçonha (Alvarenga *et al.*, 2012). Esses canais são de extrema importância nos neurônios, uma vez que são responsáveis pela despolarização da membrana para que ocorra a transmissão do impulso nervoso (Cestèle & Catterall, 2000; Gurevitz, 2012).

Até o momento, *T. serrulatus* possui seis toxinas descritas que atuam em canais para sódio. As toxinas Ts3, Ts5 e Ts2 são  $\alpha$ -toxinas, sendo que as duas primeiras são consideradas as toxinas mais letais da peçonha (Martin-Euclaire, *et al.*, 1994; Arantes *et al.*, 1994; Cologna *et al.*, 2012). Já a Ts2, foi recentemente classificada nesse grupo, pois apresenta

ação similar as  $\alpha$ -toxinas, porém possui alta similaridade de sequência a  $\beta$ -toxina Ts1 (Cologna *et al.*, 2012). A toxina Ts1 pertence à classe das  $\beta$ -toxinas escorpiônicas e representa cerca de 15% da peçonha desse escorpião (Barhanin *et al.*, 1982; Cologna *et al.*, 2009). As novas toxinas Ts17 e Ts18 foram descritas por Alvarenga *et al.* (2012), com base em uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha. A toxina Ts17 tem alta similaridade com as  $\alpha$ -toxinas Ts3 e Ts5, enquanto a Ts18 se assemelha a toxina U1-buthitoxin-Hj1a, predita para a espécie *Hottentotta judaicus*.

Além das toxinas que atuam em canais para sódio dependentes de voltagem, existem ainda toxinas que atuam em outros canais iônicos, contribuindo para a ação tóxica da peçonha como as toxinas que atuam em canais para potássio (Becerril *et al.*, 1997; Legros *et al.*, 1998; Cologna *et al.*, 2009; Cologna *et al.*, 2011). As toxinas que agem em canais para potássio representam 22% das EST's relativas à peçonha (Alvarenga *et al.*, 2012). São descritas para *T. serrulatus* sete toxinas desse grupo. As toxinas Ts6, Ts7 e Ts15 são consideradas  $\alpha$ -KTx, diferindo em sua sequência primária e subtipo de canal alvo. Já as toxinas Ts8 e Ts19 são consideradas pertencentes à família  $\beta$ -KTx. As Ts9 e Ts16 são  $\kappa$ -KTx (Cologna *et al.*, 2009; Alvarenga *et al.*, 2012). Nesse sentido, ainda não foram descritas toxinas com ação direta em canais para cloro e cálcio em *T. serrulatus*.

As enzimas presentes na peçonha, como hialuronidases e proteases, também contribuem para o processo de envenenamento. Porém, o mecanismo de ação desses componentes no envenenamento ainda é pouco estudado (Pessini *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2002; Venâncio *et al.*, 2013; Horta *et al.*, 2014; Carmo *et al.*, 2014). As hialuronidases possuem ação de clivagem do ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular. Sua atividade é relatada como um fator de dispersão da peçonha através dos tecidos, fazendo com que a peçonha seja distribuída mais rapidamente no organismo (Pessini *et al.*, 2001). Horta *et al.*, (2014) descreveram duas hialuronidases a partir do cDNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus*, nomeadas de TsHyal-1 e TsHyal-2. Os autores demonstraram que a neutralização dessa enzima diminui a ação tóxica dessa peçonha. Com 121,6  $\mu$ L de soro anti-TsHyal é possível a proteção completa de 1 DL<sub>50</sub> e quantidades inferiores de soro são capazes de diminuir o tempo de óbito dos camundongos.

Recentemente, outra classe de enzimas foi descrita para esse escorpião, as proteases. A atividade proteolítica nessa peçonha é discreta, com necessidade de grande quantidade de peçonha para a detecção de tal atividade. Porém, alguns trabalhos descreveram a ação proteolítica juntamente com a sequência da primeira protease da peçonha de *T. serrulatus*, a

metaloprotease Antarease (Almeida *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2010; Venâncio *et al.*, 2013). O trabalho desenvolvido nessa tese, através de uma biblioteca de cDNA conseguiu identificar dez diferentes proteases pertencentes a classe das metaloproteases denominadas TsMS 1-10 (Carmo *et al.*, 2014). Com o auxílio de uma nova biblioteca de cDNA da glândula de peçonha desse escorpião outras proteases presentes na peçonha foram descritas.

### **1.8.3 Tratamento de escorpionismo**

As neurotoxinas presentes na peçonha de *T. serrulatus* desencadeiam um padrão complexo de sinais e sintomas na vítima de envenenamento, que pode levar à morte. Há acometimento dos sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo e nervoso. O principal sintoma é intensa dor local, porém outros sintomas, como leves sinais inflamatórios, hipertensão, sudorese, agitação, taquicardia, náuseas, vômitos, edema pulmonar e choque podem ser observados em casos com maior gravidade (Ministério da Saúde, 2001; 2009).

Os sinais clínicos e a idade do acidentando são os principais fatores observados na classificação da gravidade do acidente escorpiônico. Os casos considerados leves recebem o tratamento sintomatológico, como analgésicos e observação clínica. Já para os casos classificados como moderados ou graves é fornecido o soro antiescorpiônico. O soro antiescorpiônico é responsável pela neutralização da peçonha circulante, impedindo que as toxinas continuem agindo na vítima (Ministério da Saúde, 2001; 2009) Nos casos em que é administrado soro antiescorpiônico (ou soro antiaracnídico), podem ser utilizadas de 2 a 6 ampolas de soro. Cada ampola possui 5 mL de soro, sendo que 1 mL e tem a capacidade de neutralizar 5 vezes a DL<sub>50</sub> (Dose Letal para 50%), ou seja, é injetada na vítima uma quantidade de soro que é responsável pela neutralização de, no mínimo, 50 vezes a DL<sub>50</sub> (Ministério da Saúde, 2001).

### **1.8.4 Problemas na produção de soro**

Apesar da eficácia do soro antipeçonha produzido, há problemas na produção, como por exemplo, o elevado custo. A peçonha escorpiônica é obtida através da extração por estimulação elétrica, e cada escorpião libera uma quantidade pequena de peçonha. Assim, deve-se extrair peçonha de vários escorpiões, sendo necessária a criação e manutenção desses animais em cativeiro, além de uma criação paralela de presas, como baratas e grilos. Além da dificuldade de obtenção de peçonha, os cavalos utilizados para a produção de soro apresentam

uma baixa sobrevida devido à ação tóxica da peçonha que é neles inoculada. Nem todos os cavalos, após os ciclos de imunização, produzem um soro com a capacidade neutralizante esperada, culminando na constante substituição da tropa e no aumento do custo de produção. Outro fator importante é o efeito de diluição dos anticorpos neutralizantes, uma vez que a peçonha apresenta diversos componentes, dentre eles, vários não tóxicos. Dessa forma, há uma produção de anticorpos contra componentes tóxicos e não tóxicos, fazendo com que os anticorpos que realmente neutralizam os efeitos da peçonha estejam mais diluídos no soro (Chippaux & Goyffon, 1998; Gazarian *et al.*, 2005; Maria *et al.*, 2005).

Assim, nosso grupo de pesquisa vem, há algum tempo trabalhando no intuito de aprimorar o soro antiescorpiônico, produzindo-o de maneira menos agressiva aos cavalos e mais direcionada aos componentes tóxicos e imunogênicos da peçonha. Para tal, é utilizada a tecnologia de produção de proteínas recombinantes e epítomos sintéticos para utilização como imunógenos (Guatimosim *et al.*, 2000; Machado de Avila *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2010).

A partir de proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, já foram caracterizadas pelo nosso grupo alguns componentes tóxicos da peçonha de *T. serrulatus* e de outros organismos (Kalapothakis *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2008; Lobato *et al.*, 2010). O primeiro componente da peçonha de *T. serrulatus* estudado na forma recombinante foi o peptídeo não tóxico TsNTxP, por Guatimosim *et al.* (2000). Esse peptídeo foi selecionado por apresentar alta similaridade com toxinas que agem em canais para sódio e por produzir, em sua forma nativa, soro com boa capacidade neutralizante contra a peçonha de *T. serrulatus* (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1997). Guatimosim *et al.* (2000) verificaram que 1 mL do soro produzido contra a TsNTxP recombinante foi capaz de neutralizar 20 DL<sub>50</sub> da peçonha de *T. serrulatus*. A toxina Ts1 recombinante foi expressa e caracterizada com duas cópias em tandem por Mendes *et al.* (2008). Nesse trabalho, 1 mL de soro anti-Ts1<sub>(2)</sub> foi capaz de neutralizar 75% de 20 DL<sub>50</sub> de peçonha bruta e 140 DL<sub>50</sub> de Ts1 nativa. Carmo (2011) caracterizou a capacidade neutralizante da toxina Ts3 recombinante expressa no vetor pET26b; porém, não foi verificada capacidade protetora do soro produzido contra a peçonha de *T. serrulatus*. A partir desse trabalho, teve início à ideia de imunização de animais utilizando-se tanto toxinas recombinantes como peçonha bruta de *T. serrulatus* como reforço. Em 2011, realizou-se uma nova construção com a toxina Ts1, que continha quatro cópias em tandem (Ts1<sub>4x</sub>). O soro anti- Ts1<sub>4x</sub> produzido não apresentou reconhecimento por ELISA

contra TsP ou Ts1 nativa. No entanto, 1 mL deste soro foi capaz de proteger 20 DL<sub>50</sub> de Ts1 nativa (Mendes, 2012).

Os trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo se mostram interessantes para o desenvolvimento de formas alternativas à imunização tradicional. Porém, ainda são necessários avanços nos estudos, para que haja a produção de um soro neutralizante a partir de imunógenos recombinantes que confira alto valor de proteção.

O presente trabalho vem inovar nossos estudos, uma vez que é o primeiro a propor a produção de soro neutralizante a partir de uma proteína quimérica baseada em toxinas de diferentes classes da peçonha de *T. serrulatus*. Dessa maneira, a imunização realizada com apenas um antígeno que carrega sequências de toxinas de canais para sódio dependentes de voltagem uma tipo  $\alpha$  e a outra tipo  $\beta$ , e ainda uma proteína imunogênica e não tóxica (Ts3, Ts1 e TsNTxP). Além do desenvolvimento da produção de soro, esse trabalho buscou por novos componentes tóxicos (proteases) presentes na peçonha que possam contribuir para a toxicidade da peçonha.

## **2. Justificativa**

O escorpionismo é um problema de saúde pública no Brasil, com registros de mais de 70.000 casos de acidentes por ano (SINAN, 2014). O soro antiescorpiônico é recomendado pelo Ministério da Saúde e é utilizado para casos moderados e graves de envenenamento (Ministério da Saúde, 2001). Esse soro é produzido no Brasil, imunizando-se cavalos com peçonha bruta de escorpião. Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de técnicas alternativas à imunização de animais e à produção de soro antiescorpiônico. Devido à alta toxicidade da peçonha, que afeta a sobrevivência dos cavalos imunizados, bem como ao alto custo de produção, esse tipo de abordagem deve ser considerada. Além disso, nossa estratégia visa buscar por novos componentes da peçonha com potencial toxicidade, como as proteases, e produzir antígenos para a geração de um soro mais eficaz e direcionado aos principais componentes tóxicos da peçonha de *T. serrulatus*.

### 3. Objetivos

Construir um cassete quimérico de expressão heteróloga para produzir um antígeno recombinante para a produção de soro. Analisar a capacidade do soro anti-quimera em neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de *Tityus serrulatus*. Identificar sequências de proteases a partir da biblioteca de cDNA. Caracterizar a ação proteolítica da peçonha como inferência a sua toxicidade.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Construir cassetes de expressão quiméricos com as sequências baseadas em toxinas;
- Expressar e purificar a construção quimérica;
- Avaliar a toxicidade da proteína quimérica em camundongos;
- Imunizar coelhos utilizando a proteína quimérica e/ou a peçonha bruta de *T. serrulatus*;
- Avaliar a reatividade dos soros anti-quimera produzidos frente à peçonha bruta de *T. serrulatus*;
- Avaliar a capacidade dos soros anti-quimera produzidos em neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de *T. serrulatus*;
- Caracterizar a ação proteolítica da peçonha de *T. serrulatus*;
- Identificar através de duas bibliotecas de cDNA as sequências relativas a proteases;
- Inferir sobre a toxicidade das proteases encontradas no processo de envenenamento.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Animais e linhagens de *E.coli* utilizadas

- Este trabalho foi submetido e aprovado pelo CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal) da UFMG, protocolo 204/2012.
- Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia fêmeas (3 a 4 quilos), obtidos na Fazenda da Escola de Medicina Veterinária da UFMG (Igarapé – MG).
- Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c fêmeas ( $20 \pm 2$  g), obtidos no centro de bioterismo (Cebio) da UFMG (Belo Horizonte - MG).
- Escorpiões (*Tiyus serrulatus*) adultos foram coletados na cidade de Belo Horizonte (19° 50' 58" S, 43° 57' 15" W).
- Linhagens de *Escherichia coli*:
  - **XL1Blue:** recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene).
  - **BL21 (DE3):** F ompT, gal hsdSB (rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>) dcm lon λDE3 (Novagem).
  - **SHffle T7 express:** fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 -TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10 (New England Biolabs-NEB)

### 4.2 Extração de peçonha de *T. serrulatus*

As extrações tiveram intervalos de 14 dias e a peçonha foi extraída por estimulação elétrica do tecido muscular adjacente à glândula de peçonha, com carga de 20 V. A peçonha de cerca de 200 escorpiões foi recolhida e diluída em água destilada/deionizada, contendo 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA). Em seguida, a peçonha foi centrifugada a 16.000  $x$  g, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante e o precipitado foram separados e armazenados a temperatura de -20°C até o momento do uso.

#### 4.3 Busca de clones na Biblioteca de cDNA para a construção de cassetes quiméricos

Nosso laboratório possui uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. Através do sequenciamento dos clones dessa biblioteca, foi encontrado o cDNA correspondente a várias toxinas (Kalapothakis *et al.*, 2001).

A busca pelo cDNA com a sequência nucleotídica de toxinas nessa biblioteca foi previamente realizada pelo nosso grupo (Alvarenga *et al.*, 2012).

#### 4.4 Vetores plasmidiais utilizados

Para este trabalho, foram utilizados dois vetores distintos: pGEM-T-Easy e pET26b (Vide mapa em Anexos I).

O vetor de clonagem pGEM-T-Easy foi selecionado por ser designado à clonagem de produtos de PCR que possuam em suas extremidades uma adenina, que gera uma extremidade coesiva. Possui resistência ao antibiótico Ampicilina e outro marcador de seleção é por IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)/X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), que leva à obtenção de colônias azuis e brancas, sendo as azuis negativas para a clonagem e as brancas positivas.

O vetor pET26b possui um amplo sítio múltiplo de clonagem (MCS) e gene de resistência ao antibiótico canamicina. Possui o forte promotor T7, que é capaz de produzir altos níveis de expressão da sequência clonada posterior a ele. As características mais marcantes são a presença do *pelB leader* e cauda de histidina como proteínas de fusão, a primeira é um peptídeo de sinal capaz de endereçar a proteína fusionada a ele ao periplasma bacteriano, facilitando o processo de purificação e a segunda é utilizada na purificação de proteínas por afinidade a íons metálicos.

#### 4.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi preparada como descrito abaixo. O controle negativo se consistiu dos reagentes sem adição de DNA, sendo que 10 ng de DNA plasmidial ou colônias bacterianas foram as amostras de interesse. As colônias bacterianas foram coletadas com auxílio de ponteiros de micropipetas estéreis para a amplificação dos fragmentos de interesse (Saiki *et al.*, 1988).

Foram adicionados ao mesmo tubo: 5  $\mu$ L de tampão IVb 5x (Phoneutria); 2,5  $\mu$ L dNTP's 1 Mm; 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase; 5 pMol de cada iniciador (0,3  $\mu$ L); 16,7  $\mu$ L de água bidestilada, com volume final de 25  $\mu$ L.

Foi usado o seguinte programa de termociclagem: 95 °C por 4 minutos; (95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos) repetidos por 30 vezes; 72 °C por 5 minutos; 4 °C  $\infty$ .

#### **4.6 Eletroforese em gel de agarose**

O gel de agarose 1,5% ou 0,8% foi preparado com tampão TAE (40 mM Tris-HCl pH 7,5; ácido acético 20mM, 1 mM EDTA pH 8,0). A amostra de DNA foi acrescida de tampão de amostra 10 x (1:10 v:v) (Phoneutria) e aplicado no gel. A eletroforese foi realizada de acordo com Sambrook *et al.*, (1989).

#### **4.7 Transformação em *E. coli***

Uma alíquota de 50  $\mu$ L de bactérias *E. coli* eletrocompetentes XL1-Blue ou BL20 (DE3) (Phoneutria) foi descongelada em banho de gelo. Foram adicionados às células 100 ng de DNA plasmidial, a amostra permaneceu em repouso por 1 minuto em banho de gelo. As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad). A cubeta foi então transferida para o eletroporador (Electroporator 2510, Eppendorf) e submetida a uma voltagem de 1800 mV, com corrente de 25  $\mu$ F e resistência de 200  $\Omega$ . Imediatamente, foi adicionado às células 1 mL de meio de cultura SOC (2% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 10 mM de NaCl; 2,5% de KCl; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de MgSO<sub>4</sub>; 20 mM de D-glicose). Cuidadosamente, as bactérias foram transferidas para um tubo de 15 mL e incubadas em repouso por 1 hora a 37°C.

Após a incubação de uma hora, as células transformadas foram transferidas para o meio LB-ágar (1 % de Peptona; 0,5 % de Extrato de levedura; 1 % de NaCl; 2 % de ágar ) com a devida concentração de antibióticos. Ao vetor pGEM-T-Easy resistente à Ampicilina (Phoneutria), a concentração final de antibiótico no meio foi de 100  $\mu$ g/mL e ao vetor pET26b, resistente à canamicina (Phoneutria), a concentração final de antibiótico no meio foi de 50  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas por 16 horas à temperatura de 37° C, para se obter colônias recombinantes resistentes ao meio seletivo.

#### **4.8 Lise alcalina para purificação plasmidial**

Uma colônia bacteriana isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB-caldo (1 % de peptona; 0,5 % de extrato de levedura; 1 % de NaCl) com antibiótico adequado, que foi incubado sob agitação à 37° C por 16 horas.

Após este período a cultura foi centrifugada a 3.000  $\times$  g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em 150  $\mu$ L de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0; 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 200  $\mu$ L de solução II (0,2 N de NaOH; 1% de SDS) e o tubo foi agitado por inversão até que a suspensão obtivesse uma consistência viscosa, caracterizando a lise celular. Foram adicionados 200  $\mu$ L de solução III (300 mM de acetato de sódio, 11,5% de ácido acético glacial) e a suspensão mantida com leve agitação e incubada em banho de gelo por 10 minutos.

Os microtubos contendo a suspensão foram centrifugados a 16.000  $\times$  g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionadas 0,6 vezes do volume do sobrenadante coletado de isopropanol 100 % e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi centrifugada novamente a 16.000  $\times$  g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial, precipitado ao fundo do tubo, foi lavado duas vezes com 0,5 mL de etanol 70%. A seguir, o DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuscitado com uma solução de TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0) contendo 10  $\mu$ 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 à solução com o DNA plasmidial um volume de fenol e foi mantido com forte agitação por 2 minutos, em seguida adicionada mais um volume de clorofórmio e mantido sob agitação por 2 minutos. A solução foi centrifugada a 16.000  $\times$  g e a fase superior formada pela solução de DNA plasmidial foi transferida para outro tubo. Foi adicionado um volume de clorofórmio e mantido com agitação por 2 minutos e novamente centrifugada como descrito anteriormente. A fase superior foi novamente recolhida e precipitada com 10% do volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto e incubadas em banho de gelo por 20 minutos e a seguir centrifugada a 16.000  $\times$  g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado duas vezes com 0,5 mL de etanol

70% e deixado secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 50  $\mu$ L de solução TE.

#### 4.9 Purificação de DNA a partir de gel de agarose

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

A banda de interesse foi cortada do gel com auxílio de um bisturi e transferida para um tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 10  $\mu$ L de “Membrane Binding Solution” para cada 10 mg de gel. O tubo foi incubado a 55°C e agitado no vortex até a completa dissolução do gel. O gel dissolvido foi transferido para uma coluna, provida pelo kit, e centrifugado a 16.000  $x g$  por 1 minuto. O gel que passou na coluna foi descartado e a coluna foi lavada duas vezes com 500  $\mu$ L de “Membrane Wash Solution” por centrifugação a 16.000  $x g$  por 1 minuto. Após a lavagem foi adicionado 30  $\mu$ L de água ultrapura a 55°C e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna foi novamente centrifugada a 16.000  $x g$  por 1 minuto e o DNA eluído foi armazenado a -20°C até o uso.

#### 4.10 Sequenciamento de DNA

Para a reação de sequenciamento capilar a partir do DNA plasmidial, foram utilizados 200 ng de DNA por reação. Os reagentes utilizados fazem parte do kit “Big Dye Terminator v3.1”; as reações procederam-se de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial e também segundo Sanger *et al.* (1977). Para o sequenciamento do vetor pGEM-T-Easy, foram utilizados os iniciadores M13 direto ou reverso. Para o sequenciamento do vetor pET26b, foram utilizados os iniciadores T7 promotor ou T7 terminador (Tabela 3).

**Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados para o sequenciamento**

<b>M13 direto</b>	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
<b>M13 reverso</b>	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
<b>T7 promotor</b>	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
<b>T7 terminador</b>	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

#### 4.11 Digestão com endonucleases de restrição

Após o sequenciamento, um clone obtido contendo a sequência única de interesse foi selecionado para o ensaio de restrição, assim como o vetor pET26b, utilizando-se as enzimas NdeI, NcoI e XhoI, (New England Biolabs).

Para cada 1 µg de DNA, foram adicionados 2 µL de tampão da enzima 10 x, 1 unidade da enzima (0,1 µL), água bidestilada para completar o volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas. O produto das reações de corte referentes aos vetores pGEM-T-Easy, contendo as sequências de interesse e o vetor de expressão pET26b linearizados, foram aplicados à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %. A banda correspondente às sequências de interesse e os vetores linearizados foram purificados do gel, conforme descrito anteriormente.

#### 4.12 Ligação de DNA ao vetor de expressão

Para a ligação das sequências de interesse ao vetor pET26b, foi realizado protocolo segundo o fabricante da enzima T4 DNA Ligase (Promega). Foram realizadas seis reações de ligação, com variação na quantidade de inserto, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Reação de ligação de DNA aos vetores de expressão

Reagentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Vetor (100 ng/µL)	1 µL					
Tampão 10x	1 µL					
T4 DNA Ligase	0,1 µL					
Fragmento de interesse	0,5 µL	1 µL	2 µL	3 µL	4 µL	5 µL
Água q.s.p. 10 µL	7,4 µL	6,9 µL	5,9 µL	4,9 µL	3,9 µL	2,9 µL

Essa reação foi realizada com volume final de 10 µL e foi incubada a 4 °C por 16 horas. Em seguida, as reações de ligação foram reunidas 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 ressuspendido em 10 µL de água bidestilada e, em seguida, eletrotransformado (5 µL) em *E. coli* XL1-Blue, como descrito anteriormente.

#### 4.13 Construção do cassete de expressão quimérico

Foram escolhidas três sequências distintas de toxinas para a construção da proteína quimérica. Essas toxinas são consideradas importantes componentes da peçonha. A Ts3 é a

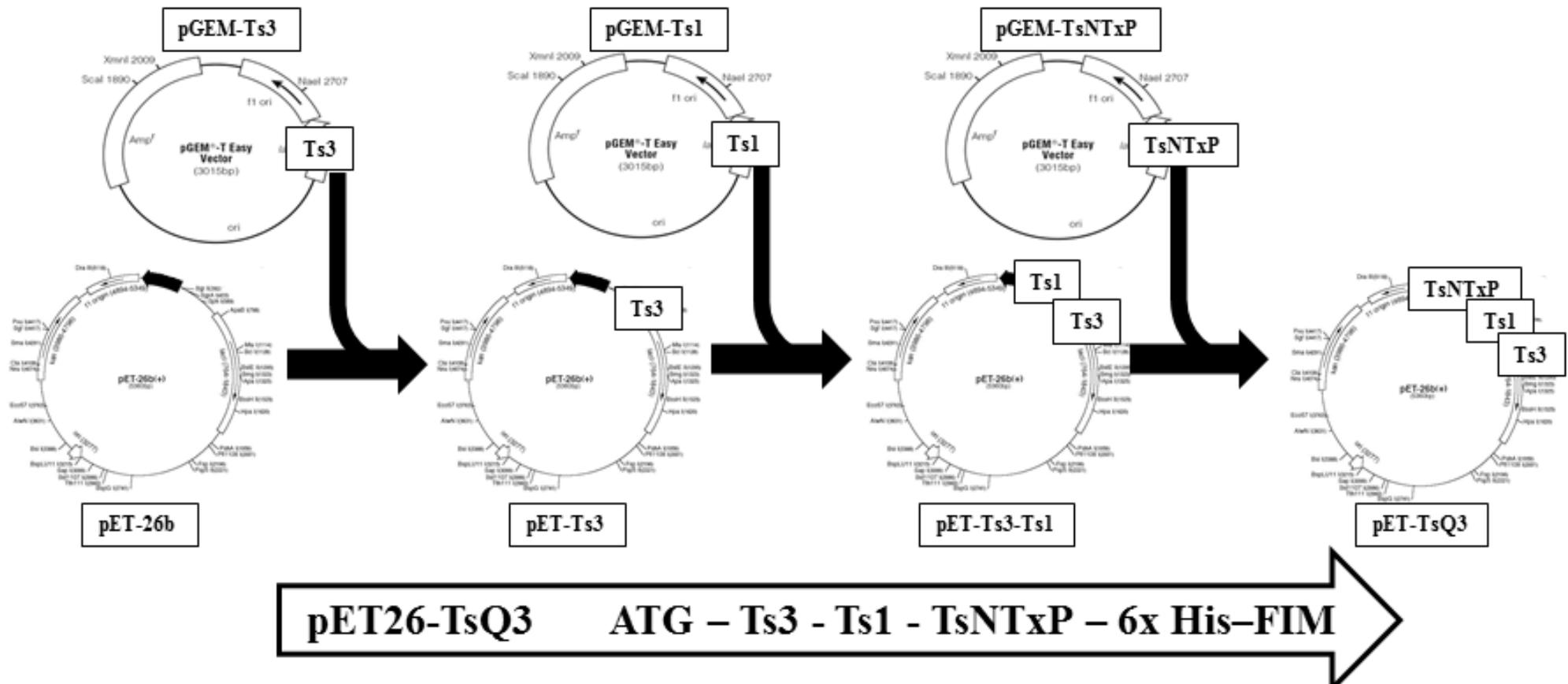
sequência de uma  $\alpha$ -toxina que age em canal para sódio; Ts1 é a sequência de uma  $\beta$ -toxina que atua em canal para sódio, a TsNTxP é a sequência de uma proteína não tóxica, porém imunogênica que possui similaridade as toxinas que atuam em canais para sódio.

A construção foi designada ao vetor pET26b. Com base nos sítios de enzimas de restrição desse vetor, foram desenhados iniciadores para cada sequência para a inserção de sítios de restrição por meio da técnica de PCR. Para tal os iniciadores possuem em suas extremidades 5' a sequência de reconhecimento de cada enzima de restrição utilizada.

A Ts3 recebeu em suas extremidades 5' e 3' os sítios de restrição para as enzimas NdeI e NcoI, respectivamente. Em seguida, a Ts1 recebeu os sítios de restrição das enzimas NcoI e XhoI nas porções 5' e 3', respectivamente. Já a TsNTxP recebeu os sítios de restrição da enzima XhoI em ambas as extremidades .

Após a PCR, os produtos de amplificação foram ligados individualmente ao vetor pGEM-T-Easy, conforme instruções do fabricante e incubados a 4°C por 16 horas antes da transformação gerando os vetores pGEM-Ts3, pGEM-Ts1 e pGEM-TsNTxP. Após a confirmação da ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T-Easy por sequenciamento, foi realizada a construção do vetor quimérico com 3 sequências diferentes.

O vetor pGEM-Ts3 foi digerido pelas enzimas de restrição NdeI e NcoI. Em seguida, o fragmento correspondente à Ts3 foi ligado ao vetor pET26b previamente digerido com as mesmas endonucleases, tornando-se o vetor pET26-Ts3. Com a confirmação dessa ligação por sequenciamento, o vetor pGEM-Ts1 foi então digerido com as endonucleases de restrição NcoI e XhoI e o fragmento correspondente à Ts1 foi ligado ao vetor pET26-Ts3 previamente digerido com as mesmas endonucleases, formando o vetor pET26-Ts3-Ts1. Por fim, o vetor pGEM-TsNTxP foi digerido com a endonuclease de restrição XhoI e ligado ao vetor pET26-Ts3-Ts1 previamente digerido com a mesma endonuclease, formando o vetor pET26-TsQ3. Dessa maneira, a sequência final obtida da TsQ3 pode ser resumida em: ATG-Ts3-Ts1-TsNTxP-His.Tag (Figura 5). O fragmento quimérico possui o tamanho de aproximadamente 600 pb.



**Figura 5: Esquema ilustrativo da construção do cassete de expressão TsQ3.**

Esquema ilustrativo da construção do cassete de expressão quimérico utilizando-se o vetor pET26b. A seta grande na parte inferior da figura simboliza a região de clonagem do vetor pET26b com a direção da expressão. O códon “ATG” indica o primeiro aminoácido a ser inserido (metionina) e “FIM” indica o códon de término. As sequências das toxinas contidas nos vetores pGEM-Ts3, pGEM-Ts1 e pGEM-TsNTxP foram retiradas do vetor pGEM e inseridas em tandem e na correta fase de leitura após o códon “ATG” no vetor pET26b. A proteína quimérica possui ainda uma cauda com 6 histidinas antes do sítio de termino de tradução.

#### **4.14 Expressão em *E. coli* da TsQ3**

Após a transformação do vetor pET26-TsQ3 em BL21 (DE3), uma colônia isolada da construção, foi coletada, transferida para 10 mL de meio 2xYT suplementado com a concentração de antibiótico adequada e incubada por 16 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm. Em seguida, cada cultura foi adicionada a 1 L de meio 2xYT com antibiótico e incubada a 37°C, com agitação de 250 rpm, até atingir a densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6 sob monitoramento a 600 nm. Ao atingir a OD desejada, foi adicionado à cultura IPTG à concentração final de 0,3 mM. A cultura foi mantida à temperatura ambiente por mais 16 horas, sob agitação de 250 rpm.

#### **4.15 Lise celular para purificação da Ts3 recombinante**

Após a expressão heteróloga, bactérias transformadas com o vetor pET26-TsQ3 foram lavadas em tampão A (250 mM NaCl; 10 mM imidazol; 100 mM Hepes pH: 7,5) para purificação em resina de níquel His-Link (Promega).

Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 30 mL do tampão A e submetidas a sonicação (Ultrason Sonifier 450) em banho de gelo por 5 vezes, com pulsos de 30 segundos. Em seguida, foram centrifugadas a 4.000  $\times$  g por 1 hora a 4°C, separando-se, assim, a fração solúvel da insolúvel.

As proteínas expressas em pET26-TsQ3 concentraram-se na fração insolúvel e foram lavadas mais 3 vezes com tampão A. O precipitado final foi ressuspensado em tampão A contendo 8 M de ureia (8 M de ureia; 250 mM NaCl; 10 mM imidazol; 100 mM Hepes pH 7,5), sendo solubilizado e submetido à purificação utilizando-se resina His-Link contendo íons de níquel.

#### **4.16 Purificação da TsQ3 recombinante**

Os corpos de inclusão solubilizados em tampão A com ureia foram ligados a 2 mL de resina His-Link (Promega), sob agitação durante 16 horas, em banho de gelo. Após esse período, a resina foi centrifugada a 4000  $\times$  g por 1 minuto e o sobrenadante foi retirado. A resina foi então lavada por 3 vezes com 30 mL de tampão A com 8 M ureia. Em seguida, acrescentou-se 30 mL de solução de sulfitólise (8 M de ureia; 50 mg/mL de sulfito de sódio;

25 mg/mL de tiosulfato de sódio; 50 mM de Tris-HCl pH 9,0) e a resina foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 4 horas. A solução de sulfitólise tem a função de reduzir as cisteínas e assim quebrar as pontes dissulfeto.

A solução de sulfitólise foi retirada por centrifugação, conforme descrito acima, e a resina foi lavada 2 vezes com 30 mL de tampão A sem ureia. A eluição foi realizada com duas frações de 5 mL de tampão A contendo 500 mM de imidazol e uma fração de tampão A contendo 8 M de ureia e 500 mM de imidazol. Todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE.

As frações resultantes contendo a TsQ3 purificada foram dialisadas em 1 L de PBS 1x, trocado três vezes. A primeira troca ocorreu após 2 horas e a segunda troca ocorreu com intervalo de 16 horas.

#### **4.17 Eletroforese SDS-PAGE**

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) preparado em placas de vidro com dimensão de 10,0 x 8,0 x 0,2 cm, com espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação era constituído de 15-18% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); (PSA) 50 mM e TEMED 0,025% (v/v). O gel de separação era preparado e colocado entre as placas de vidro, ao se polimerizar era preparado o gel de concentração que foi colocado sobre o gel de separação. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante 2x para SDS-PAGE (100 mM de Tris-HCl pH:6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de -mercaptoetanol; 20% de Glicerol) com redução e incubadas a 100°C durante 5 minutos e aplicadas no gel.

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

#### 4.18 Dosagem de proteínas por Lowry

A quantificação de proteínas da peçonha bruta de *T. serrulatus* e das proteínas recombinantes foi realizada segundo método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando o Kit protein DC (Bio-Rad), com ensaio em placa de 96 poços.

As amostras, em duplicata, foram aplicadas na placa com volume de 5 µL. A curva padrão foi construída com 7 pontos de albumina bovina com concentração conhecida (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mg/mL), como branco foi utilizado água ultrapura. As amostras a serem dosadas foram aplicadas em diluições de 1:2; 1:5 e 1:10. Após a aplicação das amostras foi adicionado 25 µL de reagente A em cada poço da placa. Em seguida foram adicionados 200 µL de reagente B. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida a absorbância foi mensurada a 665 nm.

A curva do padrão foi feita no programa Excel usando regressão linear, a equação da reta foi utilizada para calcular a concentração das amostras. Foram consideradas somente as absorbâncias das diluições que se encontrarem dentro do limite mínimo e máximo imposto pelo padrão. Equação da reta:  $y = Bx + A$  Então,  $x = (y - A)/B$ . Sendo que  $y$  é a absorbância e o  $x$  é a quantidade de proteína.

#### 4.19 Teste de toxicidade da proteína quimérica

A proteína TsQ3 foi inoculada por via subcutânea em 8 camundongos (Balb/c 20 g ± 2 g) divididos em dois grupos. O primeiro grupo de 4 animais recebeu 500 µg de TsQ3 e o segundo grupo recebeu 1 mg da mesma. Os camundongos foram observados por 24 horas caso houvesse apresentação de efeitos tóxicos oriundos da TsQ3.

#### 4.20 Imunização dos Coelhos

Para a produção dos soros, foram utilizadas oito coelhas fêmeas divididas em quatro grupos. A imunização foi realizada com a peçonha bruta de *Tityus serrulatus* (TsP), bem como com a proteína quimérica TsQ3 expressa pelo vetor pET26-TsQ3. Foram coletados 2 mL de sangue de cada animal para a obtenção de soro pré-imune antes do início das imunizações.

A primeira dose de antígeno (TsQ3 ou TsP) foi aplicada com 1 mL de adjuvante completo de Freund's . O antígeno foi emulsificado em adjuvante, em seguida, aplicado via

subcutânea em quatro pontos no dorso da coelha. Para as doses seguintes, o antígeno foi aplicado com 1 mL de adjuvante incompleto de Freund's. Foram realizados dois ciclos de imunização, com intervalo de 2 meses entre eles. Cada ciclo consistiu em seis doses, realizadas com intervalos de tempo de 15 dias. Após 15 dias de cada imunização, foi realizada a coleta de 2 mL de sangue dos animais para ensaio de ELISA.

Segundo esquema de imunização representado na Tabela 5, em cada ciclo de imunização, grupo 1 recebeu 6 doses de TsQ3; o grupo 2 recebeu 6 doses de TsP; o grupo 3 recebeu 2 doses de TSQ3 e 4 doses de TsP, nessa ordem e o grupo 4 recebeu 2 doses de TsP e 4 doses de TsQ3, nessa ordem .

**Tabela 5: Esquema de um ciclo de imunização das coelhas, com intervalos de 15 dias entre as doses**

<i>Grupo/Antígeno</i>	<i>Antígeno/μg</i>						
	<i>Coelha</i>	<i>Dose 1</i>	<i>Dose 2</i>	<i>Dose 3</i>	<i>Dose 4</i>	<i>Dose 5</i>	<i>Dose 6</i>
<b>1 – TsQ3</b>	1	TsQ3/100	TsQ3/150	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200
	2	TsQ3/100	TsQ3/150	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200
<b>2 – TsP</b>	3	TsP/100	TsP/150	TsP/200	TsP/200	TsP/200	TsP/200
	4	TsP/100	TsP/150	TsP/200	TsP/200	TsP/200	TsP/200
<b>3 – TsQ3/TsP</b>	5	TsQ3/100	TsQ3/150	TsP/200	TsP/200	TsP/200	TsP/200
	6	TsQ3/100	TsQ3/150	TsP/200	TsP/200	TsP/200	TsP/200
<b>4 – TsP/TsQ3</b>	7	TsP/100	TsP/150	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200
	8	TsP/100	TsP/150	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200	TsQ3/200

Doses crescentes em μg. Ex.: TsP/100 = dose de 100 μg de TsP.

#### 4.21 ELISA

A placa de ELISA foi sensibilizada com 100 μL de antígenos diluídos a 5 μg/mL em tampão carbonato (15 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 35 mM de NaHCO<sub>3</sub>; pH da solução 9,6) e incubada por 16 horas a 4°C de acordo com Chávez-Olórtegui *et al.* (1991). 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 4 lavagens com solução de lavagem, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora com soro imune e pré-imune com diluições seriadas em tampão de incubação (0,2% de caseína em PBS e 0,05% de Tween 20). A placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem e incubada a 37°C por 1 hora com anticorpo conjugado anti-IgG de coelho ligado a peroxidase e diluído 1:5.000 em tampão de incubação. A placa foi novamente lavada seis vezes e em seguida adicionada 100 μl por poço de solução de substrato (Kit Fast OPD tablet - Sigma). A placa foi deixada 15 minutos abrigada da luz e a reação foi interrompida com 20 μl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

Os soros foram titulados por essa metodologia com diluições seriadas entre 1:100 – 1:102.400. Para efeito comparativo, os soros referentes aos primeiros reforços de antígeno foram diluídos em 1:400 e comparados com o soro final na mesma diluição.

#### **4.22 Western Blot**

As amostras proteicas foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE e em seguida transferidas para membrana de PVDF (0,45 µm - Millipore), sob corrente de 100 V 350 mA por 2 horas. As proteínas foram então submetidas ao reconhecimento do anticorpo primário como descrito por Guatimosin *et. al.* (2000). A membrana foi bloqueada por 1h em PBS contendo 0,3% de Tween 20. A membrana foi lavada três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e incubadas por uma hora em temperatura ambiente com soro imune de interesse. A seguir, a membrana foi novamente lavada como anteriormente e adicionou-se o anticorpo conjugado na diluição de 1:2.500 em PBS. A membrana foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com 0,05% tween 20 em PBS e duas lavagens com PBS 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Towbin *et. al.*, 1979).

#### **4.23 Determinação da DL<sub>50</sub>**

Foram utilizados 5 grupos com 10 camundongos Balb/c fêmeas com peso de 20 ± 2 g. As doses foram deduzidas levando em consideração o fator de diluição 1,3. Cada dose possui volume de 100 µL de TsP em PBS e foi aplicada por via subcutânea no dorso dos camundongos. Para o cálculo do valor da DL<sub>50</sub>, os valores das doses foram transformados em logaritmo Log<sub>10</sub>. O cálculo foi realizado pelo programa GraphPad Prism 5, com o uso de regressão linear dose-resposta.

#### **4.24 Soro neutralização**

Para o ensaio de neutralização, foram realizados 2 ensaios com 4 camundongos por grupo (total de 8 animais por grupo), fêmeas da linhagem Balb/c com peso de 20 ± 2 g. Para

cada animal foi utilizado 100 µL de soro imune com dose variável de TsP com base no valor encontrado na DL<sub>50</sub>, o soro e a peçonha foram incubados a 37°C por 1 hora. Após incubação o soro foi aplicado em via subcutânea e os camundongos foram observados por 24 horas.

#### 4.25 Avaliação da atividade proteolítica de TsP

A atividade de ação proteolítica foi realizada com a utilização de fibrinogênio bovino (Sigma) como substrato. O ensaio foi realizado com 5 µg de fibrinogênio e 3 µg de TsP em tampão Tris-HCl (50 mM Tris-HCl pH: 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM ZnSO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>) em volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 37 °C. Foi avaliado o tempo de reação por 1, 4 e 16 horas. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de tampão de amostra para gel SDS-PAGE e incubada por 5 minutos a 100 °C.

Após a determinação do melhor tempo para a clivagem foi realizado ensaio de inibição da atividade proteolítica com inibidores classe-específico para quatro classes de proteases, metaloproteases (20 mM de EDTA), serino proteases (2 mM de PMSF), cisteíno proteases (20 µM de E-64) e ácido aspártico proteases (20 µM de Pepstatina A).

A avaliação de clivagem proteolítica foi realizada pela eletroforese SDS-PAGE 15%.

#### 4.26 Identificação dos sítios de clivagem das proteases da peçonha

A especificidade de clivagem das proteases da peçonha de *T. serrulatus* foi analisada utilizando uma biblioteca do kit REPLi contendo 3375 peptídeos divididos em 512 poços (*Internally quenched fluorogenic*) (Mimotopes). Essa biblioteca foi validada anteriormente por proteases recombinantes e fluidos biológicos complexos. (Thomas *et al.*, 2006; Watson *et al.*, 2011). Os peptídeos funcionam como sondas ópticas que não emitem fluorescência se não forem clivadas, mas se ocorrer clivagem os peptídeos emitem fluorescência proporcional a quantidade de peptídeos clivados. A biblioteca de peptídeos possui a seguinte sequência de configuração: MCA-G-G-G-1°-2°-3°-G-G-DPA-K-K, em que MCA corresponde ao 7-methoxycoumarin-4-acetic acid (fluoróforo) e DPA corresponde ao *N<sup>b</sup>-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionic acid* (quencher). Na porção C-Terminal são adicionados 2 resíduos de lisina para o aumento de solubilidade de sequências hidrofóbicas. Os aminoácidos marcados como 1°, 2° e 3° correspondem a resíduos variáveis que são colocados na placa de maneira a permanecerem misturas equimolares das seguintes combinações: A/V, D/E, F/Y, I/L, K/R,

N/Q, S/T, ou P. Em cada poço das placas da biblioteca de peptídeos contém uma mistura equimolar de até 8 peptídeos individuais (5 nM de peptídeos por poço). São excluídos da biblioteca resíduos que são quimicamente incompatíveis (C e M), resíduos que interferem na fluorescência (W) ou resíduos que raramente são encontrados em sítios de clivagem de proteases (H).

Os peptídeos foram dissolvidos em 5 µL de acetonitrila 50%, agitados em agitador de placas por 1 minuto e em seguida diluídos em 45 µL de tampão Tris-HCl (30 mM Tris-HCl, pH: 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM ZnSO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>) e novamente agitado por mais 1 minuto. A peçonha de *T. serrulatus* foi diluída no mesmo tampão para a contração final de 40 µg/mL. Depois da leitura do branco, foi adicionado 50 µL de tampão com peçonha (2 µg de peçonha por poço). Os dados da cinética enzimática foram obtidos com o fluorímetro Varioskan Flash multimode (Thermo Scientific) utilizando dois filtros, 320 nm para excitação e 420 nm para emissão com leituras realizadas a cada 2 minutos durante 1 hora de ensaio com temperatura constante de 37°C. Para se alcançar os valores de saturação de fluorescência e pontos de clivagem não específicos, pelas proteases da peçonha, as placas foram seladas após o ensaio e incubadas por 48 horas ao abrigo de luz a temperatura ambiente. Os valores de fluorescência foram calculados pela subtração da leitura do branco.

## **4.27 RNA-Seq da glândula de peçonha**

### **4.27.1 Extração de RNA da glândula de peçonha**

Foram divididos quatro grupos com 10 escorpiões cada. No primeiro grupo, chamado de G0 não foi realizado prévia extração de peçonha. Nos demais grupos, chamados de G2, G4 e G8 houve prévia extração de peçonha realizada com antecedência de 2, 4 e 8 dias respectivamente à extração de RNA.

O telson dos escorpiões de cada grupo foi retirado e em seguida macerado com auxílio de triturador em 500 µL de TRI Reagent (Sigma). A solução foi mantida em repouso por 10 minutos e em seguida acrescido 100 µL de clorofórmio (Synth) e homogeneizado, a solução foi centrifugada a 16.000  $\times$  g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante aquoso foi recolhido e transferido para um novo tubo, em seguida o RNA foi precipitado com 300 µL de isopropanol (Synth) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. O RNA foi centrifugado por 10 minutos a 16.000  $\times$  g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol

80% por duas vezes. O RNA foi seco a temperatura ambiente e em seguida ressuspenso com 100 µL água ultrapura (Phoneutria) e incubado por 30 minutos a 56 °C para a completa dissolução do RNA. A quantificação foi realizada com o fluorímetro Qubit 2.0 (Life) e a análise de qualidade realizada em Nanodrop (Thermo) com base nos valores das razões das absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm, valores de referência para ambas as razões estão entre 1,8 e 2,2.

#### 4.27.2 Construção da biblioteca para sequenciamento

A primeira biblioteca de cDNA glândula de peçonha foi construída por Kalapothakis *et al.*, (2001) e foi sequenciada com sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems) por Alvarenga *et al.* (2012).

Para o sequenciamento de nova geração as bibliotecas foram construídas utilizando o kit TruSeq™ RNA Sample Prep Kit v2 Set A (Illumina) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo as bibliotecas foram montadas conforme descrito a seguir:

- Purificação do mRNA com *beads magnéticas* contendo oligo (dT).
- Fragmentação do mRNA purificado.
- Síntese do cDNA, 1ª e 2ª fita com a enzima Superscript II.
- Reparo das extremidades para a geração extremidades cegas.
- Adenilação da ponta 3'.
- Ligação dos adaptadores contendo *index* (sequência código para identificação de amostras), As bibliotecas G0, G2, G4 e G8 receberam os index A004, A005, A006 e A007 respectivamente.
- Amplificação da biblioteca com base nas sequências adaptadoras.
- Purificação da biblioteca com *beads magnéticas*
- Quantificação com o kit de qPCR “Library Quantification Kit - Illumina/Universal” (Kapa).

O kit de quantificação utiliza a química de Sybr Green e curva padrão para a quantificação das bibliotecas Illumina. O protocolo fornecido pelo fabricante foi seguido para a montagem das reações e programa de termociclagem. A quantificação foi realizada com

iniciadores específicos aos adaptadores inseridos nas amostras. A curva padrão contém 5 pontos conhecidos com diluição seriada de 1:10 (20 pM; 2 pM; 0,2 pM; 0,02 pM e 0,002 pM). Uma alíquota de cada uma das 4 bibliotecas foi diluída para as concentrações de 1:1.000; 1:10.000 e 1:100.000 para ser utilizada para a inferência da concentração final da biblioteca. Todas as amostras e o padrão foram aplicados em duplicata na placa de 0,1 mL.

A média dos valores encontrados nos três pontos de diluição foi utilizada para a correção do cálculo da quantificação seguindo a fórmula: média do valor de concentração x (452/média do tamanho da biblioteca) x diluição da biblioteca.

Os valores de concentração de cada biblioteca são extremamente importantes para o passo de sequenciamento.

#### **4.27.3 Sequenciamento de nova geração - MiSeq-Illumina**

As bibliotecas quantificadas foram diluídas para a concentração de 4 nM. Assim foi realizado um *pool* com 10 µL de cada biblioteca e homogeneizado com auxílio de vortex. O *pool* de bibliotecas foi desnaturado por 5 minutos com 5 µL do *pool* e 5 µL de NaOH 0,2 N. Após incubação foi adicionado a biblioteca desnaturada 990 µL de solução HT1 provida no kit de sequenciamento. A biblioteca desnaturada obtida na concentração de 20 pM foi novamente diluída para a concentração de 15 pM com a adição de 250 µL de solução HT1 e 750 µL da biblioteca. O *pool* das bibliotecas desnaturadas na concentração de 15 pM (600 µL) foi aplicado no cartucho de sequenciamento.

As bibliotecas foram sequenciadas no sequenciador de nova geração MiSeq (Illumina). Foi utilizado um cartucho de 600 ciclos com a estratégia de sequenciamento *paired-end* com 2 x 300 ciclos. O resultado do sequenciamento gera um arquivo fastq (arquivo de sequência e qualidade de cada base) para cada uma das quatro bibliotecas. Foi programado para o sequenciador MiSeq remover as sequências adaptadoras. Cada fragmento de DNA sequenciado é chamado de *read*.

#### **4.27.4 Trimagem das *reads***

A trimagem de sequências em bioinformática pode ser definida como a retirada de trechos pré-definidos, como sequências adaptadoras, ou que apresentem baixa qualidade. A

retirada dessas sequências das *reads* diminui a probabilidade de erro o durante o processo de montagem dos contigs.

O sequenciador MiSeq gera os arquivos fastq que possuem a sequência nucleotídica e um valor de qualidade associado a cada base. O valor de qualidade é baseado no valor de Phred (Ewing *et al.*, 1998). O valor de Phred (Q) é definido como o logaritmo da probabilidade de erro de uma base, ou seja, para um valor de Q20, temos a chance de 1 base errada em 100 bases.

Para o melhor alinhamento das sequências, os arquivos fastq gerados no sequenciamento foram trimados com base no valor de Phred. Todas as bases com valor menor do que Q20 foram retiradas das *reads* a partir da extremidade 3', assim como as *reads* com tamanho inferior a 40 pb com o auxílio do programa Prinseq lite (Schmieder & Edwards, 2011).

Foi utilizada a seguinte linha de comando:

```
prinseq-lite.pl -verbose -fastq -out_good '-out_bad -min_len 40 -
trim_qual_right 20 -trim_qual_window 100 -trim_qual_step 1 -trim_qual_type
min -out_format 5
```

No qual os comandos a seguir significam:

- **yprinseq-lite.pl**: comando executável do programa.
- verbose**: relatório do andamento do processo.
- fastq**: tipo de arquivo de entrada.
- out\_good**: pasta/nome do arquivo com as sequências filtradas.
- out\_bad**: pasta/nome do arquivo com as sequências que não passaram pelo filtro.
- min\_len**: tamanho mínimo de 40 bases nas *reads* filtradas.
- trim\_qual\_right**: retirada das sequências a partir da extremidade 3'.
- trim\_qual\_window**: trimagem por uma janela de 100 nucleotídeos.
- trim\_qual\_step**: um nucleotídeo analisados por vez na janela.
- trim\_qual\_type**: retirada das sequências com valor de Q < 20.
- out\_format**: output com arquivos nos formatos fasta, qual ou fastq.

Antes e após a trimagem das sequências foi utilizado o programa ‘fastqc’ para gerar uma análise de qualidade nas sequências e assim verificar se a qualidade após a trimagem (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>).

Foi utilizada a seguinte linha de comando para esse fim:

```
fastqc -o 'pasta onde será salvo o arquivo de output' -f fastq  
'pasta/nome do arquivo a ser analisado'
```

No qual os comandos a seguir significam:

**fastqc:** comando para o programa rodar.

**-o:** pasta onde será salvo o arquivo de resultado.

**-f:** tipo de arquivo de entrada. (espaço) pasta/nome do arquivo de entrada.

Após análise de qualidade dos arquivos de sequências foi montada uma tabela com dados das *reads*.

#### 4.27.5 Montagem dos *contigs*

Os clones provenientes da primeira biblioteca de cDNA foram agrupados em *contigs* com o programa CodonCode Aligner 4.0.

Após o sequenciamento das quatro bibliotecas no sequenciador MiSeq (Illumina) as *reads* geradas foram montadas com o programa Tinity, que foi desenvolvido para a montagem *de novo* de RNA-Seq (Grabherr *et al.*, 2011).

O pacote Trinity monta os *contigs* com base em três programas, Inchworm, Chrysalis e Butterfly:

Inchworm monta o RNA-Seq em sequências únicas de transcritos, assim geram um transcrito completo com a isoforma dominante, mas relata porções únicas de transcritos, como um *Splicing alternativo*.

Chrysalis forma *clusters* com os *contigs* montados pelo Inchworm e constrói gráficos de *de Bruijn* para cada *contig*. Cada conjunto representa a complexidade transcricional de cada gene (ou conjuntos de genes que compartilham sequências em comum), ou seja, ele particiona a leitura inicial de Inchworm em gráficos distintos.

Butterfly processa os gráficos individuais em paralelo, traçando caminhos que as *reads* ou seus pares estão dentro do gráfico. Em última análise ele reporta cada splicing alternativo e isoformas para cada gene.

Foram utilizados os comandos padrão do programa. A linha de comando utilizada foi:

```
"/Trinity --seqType fq --JM 50G --left Reads_R1.fastq --right Reads_R2.fastq --CPU 6 --normalize_by_read_set --output output_G".
```

**./Trinity:** é o comando executável do programa.

**--seqType:** tipo de biblioteca, fa (fasta) ou fq (fastq).

**--JM:** Quantidade de memória RAM a ser utilizada na montagem.

**--left:** Reads paired-end R1.

**--right:** Reads paired-end R2.

**--CPU:** número de núcleos do processador a serem utilizados.

**--normalize\_by\_read\_set:** normaliza a corrida separadamente para cada par de arquivos fastq, então uma normalização final que combina *reads* individuais normalizadas.

**--output:** local/nome do arquivo de saída do programa.

#### 4.27.6 Identificação dos *contigs* com similaridade a proteases

Foram utilizados os dados gerados pelas duas bibliotecas de cDNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus* para a identificação de proteases presentes nesse tecido. A biblioteca de cDNA confeccionada por Kalapothakis *et al* (2001) foi utilizada inicialmente. As bibliotecas confeccionadas nesse trabalho foram utilizadas posteriormente para confirmar os dados alcançados e identificar novas sequências.

A identificação dos *contigs* com similaridade a proteases foi realizada com o auxílio do programa Blastx stand-alone. Foram utilizados os dados da montagem realizada com o programa Trinity referente ao RNA-Seq sequenciado no MiSeq. O banco de dados de proteínas utilizado para a realização do Blastx foi obtido pelo site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com base em sequências de proteínas. Foram utilizados os termos “(((protease) NOT inhibitor) NOT ubiquitin) AND arthropoda[Organism]” para a

montagem do banco de dados de sequências proteicas em formato FASTA. O banco de dados montado possui 26251 sequências.

As sequências resultantes da busca de similaridade foram filtradas de acordo com os parâmetros: tamanho do alinhamento (alinhamentos maiores do que 100 aminoácidos), identidade igual ou maior a 70% e a eliminação de contigs que alinham com mais de 1 sequência referencial. Dentre as sequências redundantes foi mantida a que apresentou maior similaridade com a sequência de referência.

#### **4.27.7 Classificação das proteases da glândula de peçonha**

Após análise de identificação, as sequências que apresentaram similaridade com proteases pelo programa Blastx stand-alone, as sequências identificadas foram selecionadas e novamente submetidas à busca de similaridade com o auxílio do programa online Blastx. As proteases foram classificadas inicialmente em duas categorias: componentes da peçonha e componentes celulares. Após essa identificação inicial as sequências foram classificadas e suas respectivas funções deduzidas de acordo com a similaridade observada.

#### **4.27.8 Identificação de domínios e similaridade**

As sequências identificadas foram analisadas quanto a presença de peptídeo sinal e propeptídeo com auxílio dos programas online SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) e Prop 1.0 (Duckert *et al.*, 2004). A identificação dos domínios foi realizada no programa online Blastp, no qual busca sequências similares de proteínas no banco de dados. Os domínios de cada protease foram identificados e suas possíveis funções determinadas (Marchler-Bauer *et al.*, 2011). A massa molecular e o ponto isoelétrico foram identificados pelo programa online ExPASy “Compute pI/Mw tool” (Gasteiger *et al.*, 2005).

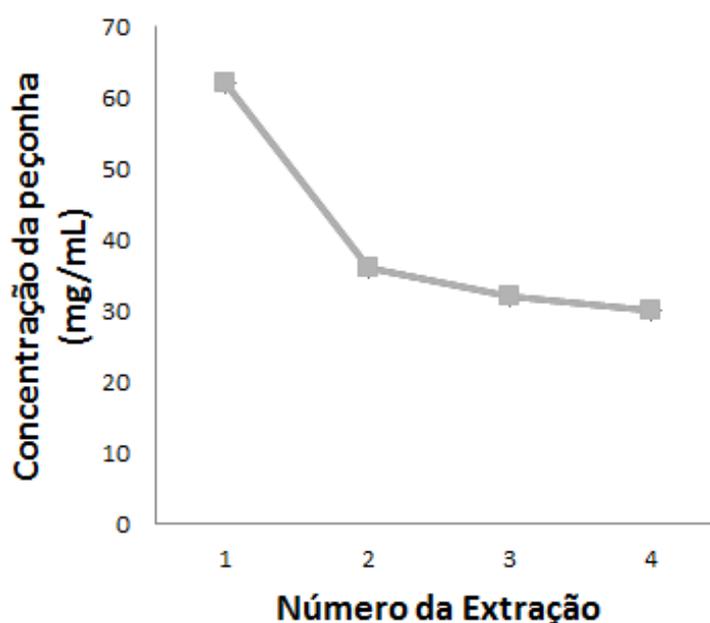
Foi realizada a construção de uma árvore filogenética para verificação da relação entre as sequências identificadas. Essas sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal W pelo programa MEGA 5, com base nesse alinhamento foi construída uma árvore utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (Zuckerkanndl & Pauling, 1965; Tamura *et al.*, 2011).

## 5. Resultados

### 5.1 Extração de peçonha de *T. serrulatus*

A extração da peçonha por estimulação elétrica resultou uma quantidade satisfatória de peçonha por animal. Nas primeiras extrações, o rendimento médio foi de 200  $\mu\text{g}$  de massa proteica da peçonha por escorpião (TsP).

Nas extrações seguintes, houve uma queda gradativa no rendimento, cerca de 25 mg/mL por extração (Figura 6).



**Figura 6:** Concentração de peçonha de *Tityus serrulatus* obtida de extrações sucessivas.

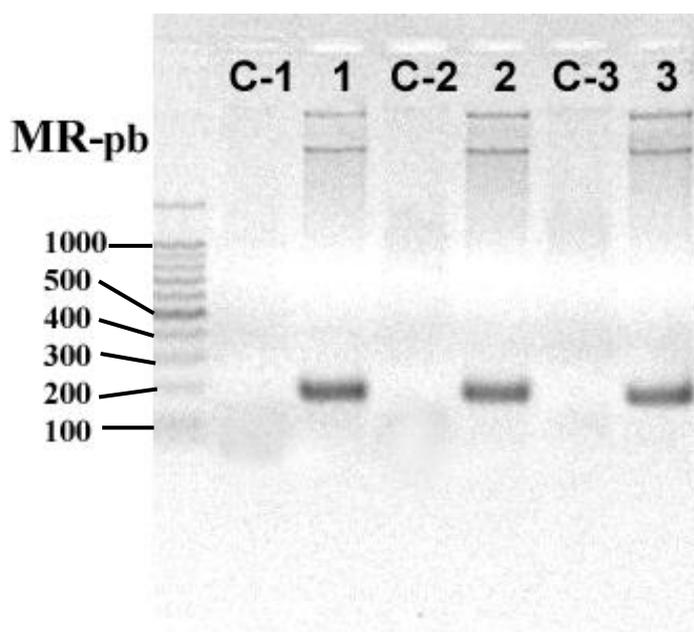
Extrações de peçonha bruta de *T. serrulatus* (TsP) mediante estimulação elétrica. Extrações realizadas com intervalo de 15 dias. A peçonha de 200 escorpiões foi extraída e imediatamente diluída em 500  $\mu\text{L}$  de TFA 0,01%. A peçonha era então centrifugada e a fração solúvel dosada pelo método de Lowry. A quantidade de peçonha obtida apresentou diminuição ao longo das extrações.

### 5.2 Construção do cassete de expressão quimérico

#### 5.2.1 PCR para inserção de adaptadores

Depois de realizada a técnica de PCR para a amplificação das sequências de interesse, Ts3, Ts1 e TsNTxP, foi realizada eletroforese para a verificação da qualidade da amplificação de todas as amostras.

Foi utilizado o mesmo programa de termociclagem para todas as sequências. A Ts3 recebeu os sítios para as endonucleases de restrição NdeI e NcoI; a Ts1 recebeu os sítios para NcoI e XhoI; enquanto a TsNTxP recebeu apenas o sítio de XhoI em suas extremidades (Figura 7). As três sequências utilizadas neste trabalho possuem cerca de 200 pb de comprimento, como visualizado no gel. Todas as três sequências amplificaram muito bem e foram utilizadas para a ligação ao vetor pGEM-T-Easy.



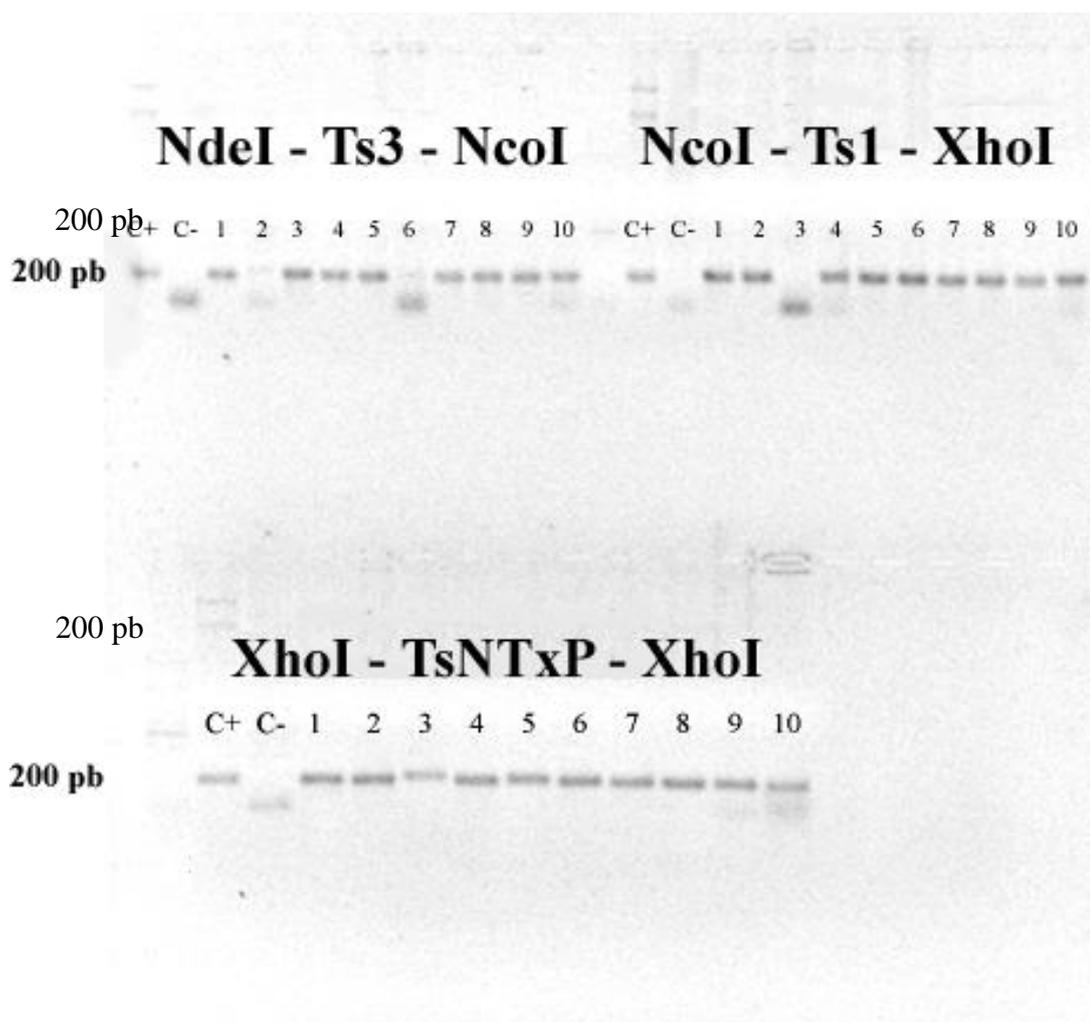
**Figura 7: PCR para amplificação das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP**

Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, apresentando o produto de amplificação das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP, utilizando os iniciadores com adaptadores específicos para cada sequência. **MR - pb**: padrão de massa molecular relativa de 100 pb; **C-1**: controle negativo Ts3, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; **1**: Amplificação da Ts3; **C-2**: controle negativo Ts1, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; **2**: Amplificação da Ts1; **C-3**: controle negativo TsNTxP, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; **3**: Amplificação da TsNTxP.

### 5.3 Clonagem de Ts3, Ts1 e TsNTxP no vetor pGEM-T-Easy

Com a boa qualidade do produto de amplificação, foi realizada a ligação dos três amplicons individualmente no vetor pGEM-T-Easy. O produto de ligação das três sequências foi então transformado na linhagem XL1-Blue de *E. coli* e 10 colônias individuais e isoladas foram coletadas para análise de PCR utilizando os iniciadores específicos para cada sequência. Clones positivos possuem o tamanho de 200 pb, enquanto os negativos não são capazes de produzir amplificação.

As três sequências obtiveram um bom rendimento nesse passo de seleção, cerca de 90% ou mais de clones positivos em todas as construções (Figura 8). Quatro clones de cada ligação foram selecionados para a reação de sequenciamento.



**Figura 8: PCR de colônia dos clones obtidos após transformação da ligação das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP em pGEM-T-Easy.**

Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio, do produto de ligação das três sequências, utilizando os iniciadores específicos para cada sequência. Foram testadas 10 colônias de cada construção. O controle positivo consiste no vetor original da biblioteca de cDNA. C+: controle positivo com DNA molde do clone selecionado na biblioteca de cDNA; C-: controle negativo, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; 1-10: colônias testadas.

#### 5.4 Sequenciamento da clonagem das sequências Ts3, Ts1 e TsNTxP no vetor pGEM-T-Easy

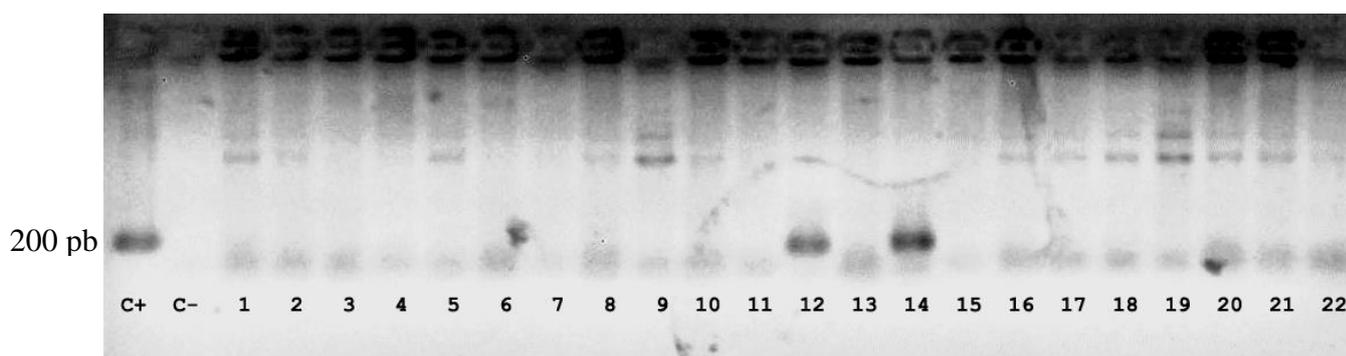
Dentre os vários clones que foram confirmados positivos pela PCR, quatro de cada sequência, foram submetidos à extração plasmidial por lise alcalina e, em seguida, sequenciados. Os resultados foram analisados de acordo com a qualidade de sequência, correta inserção dos adaptadores e fase de leitura. Todos os clones referentes às três sequências apresentaram boa qualidade em todos os parâmetros e foram submetidos à digestão enzimática para a ligação ao vetor pET26b.

## 5.5 Construção do vetor de expressão pET26-TsQ3

### 5.5.1 Construção do vetor de expressão pET26-Ts3

A primeira sequência a ser inserida no vetor pET26b foi a Ts3. Após digestão enzimática com as endonucleases NdeI e NcoI ao vetor pGEM-Ts3 e ao vetor pET26b, ambos os plasmídeos foram submetidos à eletroforese e a banda referente à Ts3 e ao pET26b linearizado foram purificadas do gel de agarose e ligadas (Figura 5).

O rendimento da digestão enzimática foi satisfatório para que fosse realizada a ligação ao vetor pET26b. Após a ligação e transformação, foram coletadas 22 colônias e, dentre elas, 2 clones foram identificados positivos através de PCR com os iniciadores da Ts3 (Figura 9). Ambos os clones foram sequenciados e apresentaram correta orientação ao vetor e fase de leitura. Esse plasmídeo obtido foi denominado pET26-Ts3.



**Figura 9: PCR de colônia para a confirmação da ligação entre pET26b e Ts3.**

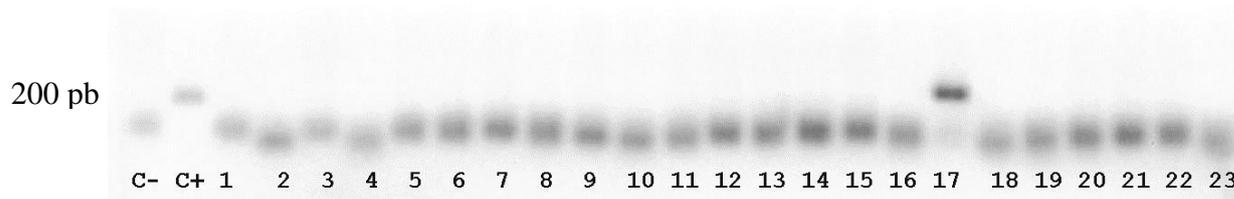
Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio, do produto de PCR da ligação entre pET26b e Ts3, utilizando os iniciadores para a Ts3. Dentre as 22 colônias testadas, apenas 2 se mostraram positivas (12 e 14). O controle positivo consiste no vetor original da biblioteca de cDNA. C+: controle positivo; C-: controle negativo, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; 1-22: colônias testadas.

### 5.5.2 Construção do vetor de expressão pET26-Ts3-Ts1

Utilizando a construção pET26-Ts3 e o plasmídeo pGEM-Ts1 como base, foram digeridos com as endonucleases de restrição NcoI e XhoI. Após a digestão, ambos os plasmídeos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. As bandas correspondentes ao vetor pET26-Ts3 e à sequência de Ts1 foram purificadas a partir do gel e submetidas à reação de ligação, conforme descrito no item 4.13 (Figura 5).

Após transformação do produto de ligação, colônias recombinantes foram coletadas e testadas por PCR de colônia, utilizando-se iniciadores específicos para a Ts1. Dentre as 23 colônias testadas, um clone foi identificado positivo (17) (Figura 10). O clone foi sequenciado

e apresentou a correta fase de leitura. O vetor foi extraído por lise alcalina e recebeu o nome de pET26-Ts3-Ts1.



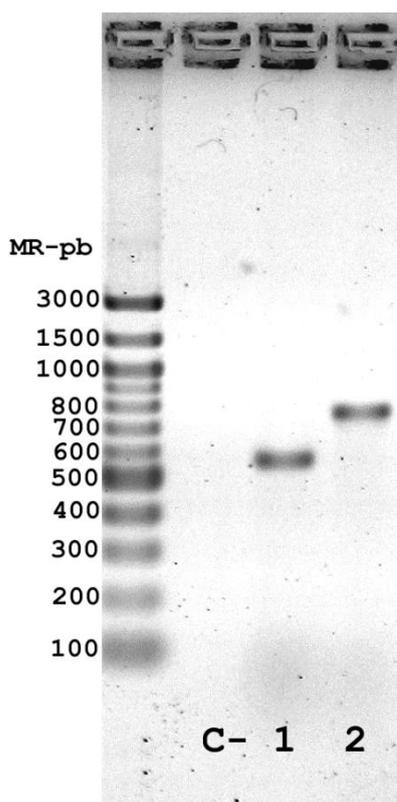
**Figura 10: PCR de colônia para a confirmação da ligação entre pET26-Ts3 e Ts1.**

Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio, do produto de PCR da ligação entre pET26-Ts3 e Ts1, utilizando-se iniciadores para a Ts1. Dentre as 23 colônias testadas, apenas 1 se mostrou positiva (17). O controle positivo consiste no vetor original da biblioteca de cDNA. C+: controle positivo; C-: controle negativo, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; 1-23: colônias testadas.

### 5.5.3 Construção do vetor de expressão pET26-TsQ3

Utilizando a construção pET26-Ts3-Ts1 e o plasmídeo pGEM-TsNTxP, estes foram digeridos com a endonuclease de restrição XhoI. Após a digestão, ambos os plasmídeos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. As bandas correspondentes ao vetor pET26-Ts3-Ts1 e à sequência de TsNTxP foram purificados a partir do gel e submetidas à reação de ligação, conforme descrito acima (Figura 5).

Após transformação do produto de ligação, foram encontradas e testadas apenas 2 colônias por PCR com os iniciadores T7F e T7R, que apresentou um clone positivo. Com o uso desses iniciadores, o fragmento negativo possui 600 pb e o positivo cerca de 800 pb, uma vez que a amplificação do vetor sem inserto possui 200 pb (Figura 11). O clone positivo foi sequenciado e mostrou a correta construção. Esse vetor recebeu o nome de pET26-TsQ3 (Ts = *T. serrulatus*; Q3 = 3 sequências distintas em forma de quiméra) (vide sequência em anexos II).

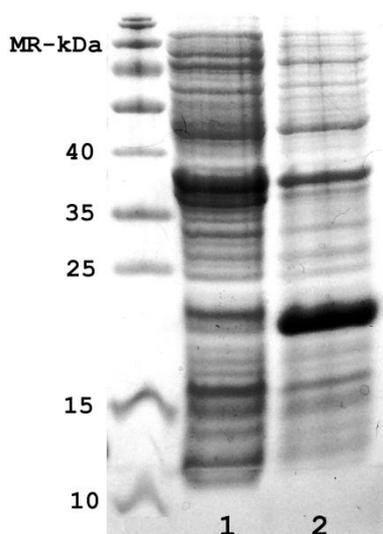


**Figura 11: PCR de colônia para a confirmação da ligação entre pET26-Ts3-Ts1 e TsNTxP.**

Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio, do produto de PCR da ligação entre pET26-Ts3-Ts1 e TsNTxP, utilizando-se iniciadores T7F e T7R. Dentre as 2 colônias testadas, apenas uma se mostrou positiva (2). Devido à distância entre o sítio de clonagem de cerca de 200 pb, o clone pET26-Ts3-Ts1 apresenta tamanho aproximado de 600 pb, enquanto o clone pET26-TsQ3 apresenta tamanho aproximado de 800 pb. **MR - pb**: padrão de massa molecular relativa de 100 pb; **C-**: controle negativo, todos os reagentes da PCR sem DNA molde; **1-2**: colônias testadas.

## 5.6 Expressão e purificação da TsQ3

Para a expressão da TsQ3, o plasmídeo pET26-TsQ3 foi transformado na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3). Após período de incubação pós-indução, foi observado um nível de expressão alto (Figura 12). A dosagem pelo método de Lowry da TsQ3 purificada mostrou um rendimento aproximado de 5 mg de por litro de cultura expressa.

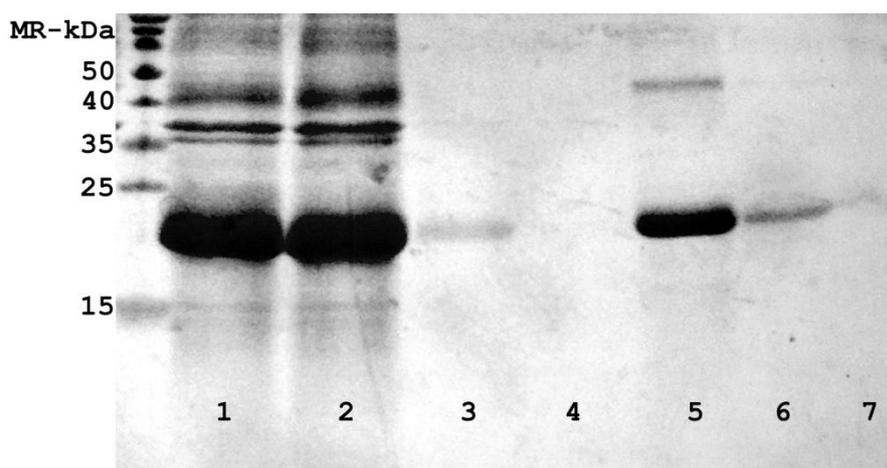


**Figura 12: Expressão da TsQ3 em BL21 (DE3).**

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE dos produtos de expressão da TsQ3. Após indução com IPTG, é observado uma grande banda correspondente à TsQ3 expressa. A banda mais destacada, com cerca de 21 kDa, é a TsQ3 (2).

**MR - pb:** Padrão de massa molecular; **1:** Extrato bruto da cultura de BL21 (DE3) transformada com pET26-TsQ3 antes da indução; **2:** Extrato bruto da cultura de BL21 (DE3) transformada com pET26-TsQ3 após 16 horas da indução.

Toda a TsQ3 se encontrou na fração insolúvel e foi totalmente solubilizada em tampão A para purificação em resina de níquel contendo 8 M de ureia. Com isso, o sobrenadante obtido foi incubado e ligado à resina His-Link para a purificação da TsQ3 contendo a cauda de histidinas. A primeira purificação não foi capaz de ligar toda a TsQ3 expressa, como observado na canaleta 2 da Figura 13. Assim, o protocolo de purificação foi repetido até se obter toda a TsQ3 contida na amostra. Após o tratamento de sulfitólise a TsQ3 se apresentou na forma solúvel (22,7 kDa) (Figura 13).



**Figura 13: Purificação da TsQ3 em resina de níquel His-Link.**

Gel de poliacrilamida 18% SDS-PAGE das frações da purificação da TsQ3 em resina de níquel. Após a lise, os corpos de inclusão resultantes foram ressuspensos em tampão com ureia e submetidos à purificação. Nem toda a TsQ3 presente foi ligada à coluna e, então, sucessivos passos com essas amostras foram realizados para a total purificação da TsQ3. **MR-kDa:** padrão de massa molecular relativa em kDa; **1:** corpos de inclusão solubilizados; **2:** amostra não ligada à coluna; **3-4:** lavagens da resina de níquel; **5-6:** Eluições da TsQ3 com tampão sem ureia; **7:** Eluição com tampão contendo ureia.

### **5.7 Teste de toxicidade da proteína quimérica**

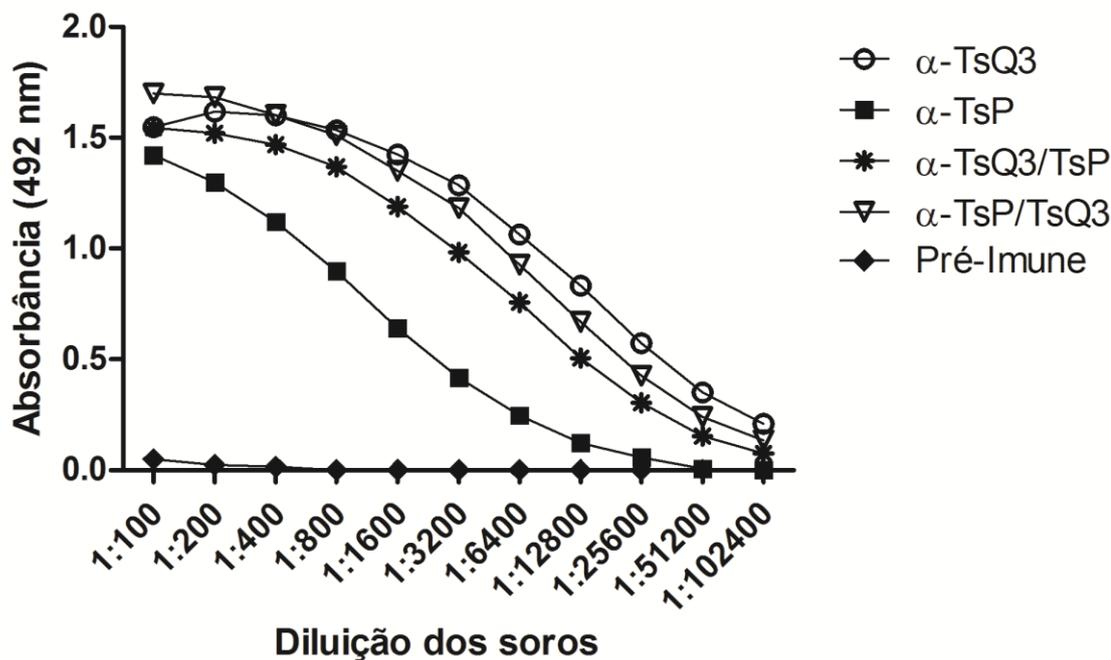
Em ambos os grupos de camundongos que receberam a TsQ3 por via subcutânea não foram observados sinais de toxicidade causados pela mesma. Assim essa proteína não possui atividade tóxica, podendo ser utilizada como antígeno para a imunização de coelhos.

### **5.8 ELISA**

Foi realizado o ensaio de ELISA para se averiguar o reconhecimento dos soros produzidos frente à TsP e TsQ3, bem como a titulação dos mesmos. A titulação dos soros finais obtidos apresentou alto grau de reconhecimento contra ambos os antígenos (Figura 14). Esse dado mostra que os soros produzidos possuem anticorpos com capacidade de reconhecer tanto a TsP quanto a TsQ3.

Os soros obtidos após as primeiras seis doses e o soro final foram comparados quanto a geração de anticorpos na diluição de 1:400. A cada dose de reforço aplicada nas coelhas, o reconhecimento dos soros produzidos contra ambos os antígenos aumentou. Os gráficos da Figura 15 mostram que a reatividade é maior nos soros referentes à terceira dose de imunização de cada grupo. A reatividade obteve um aumento considerado maior nas amostras de soro colhidas após os reforços seguintes, após o término do segundo ciclo de imunizações os soros apresentaram grau de reconhecimento similar a 6ª dose do primeiro ciclo (considerando a diluição testada). Apenas o soro anti-TsQ3 ( $\alpha$ -TsQ3) não foi capaz de reconhecer de maneira mais efetiva TsP.

## A) Titulação dos soros contra a TsQ3



## B) Titulação dos soros contra a TsP

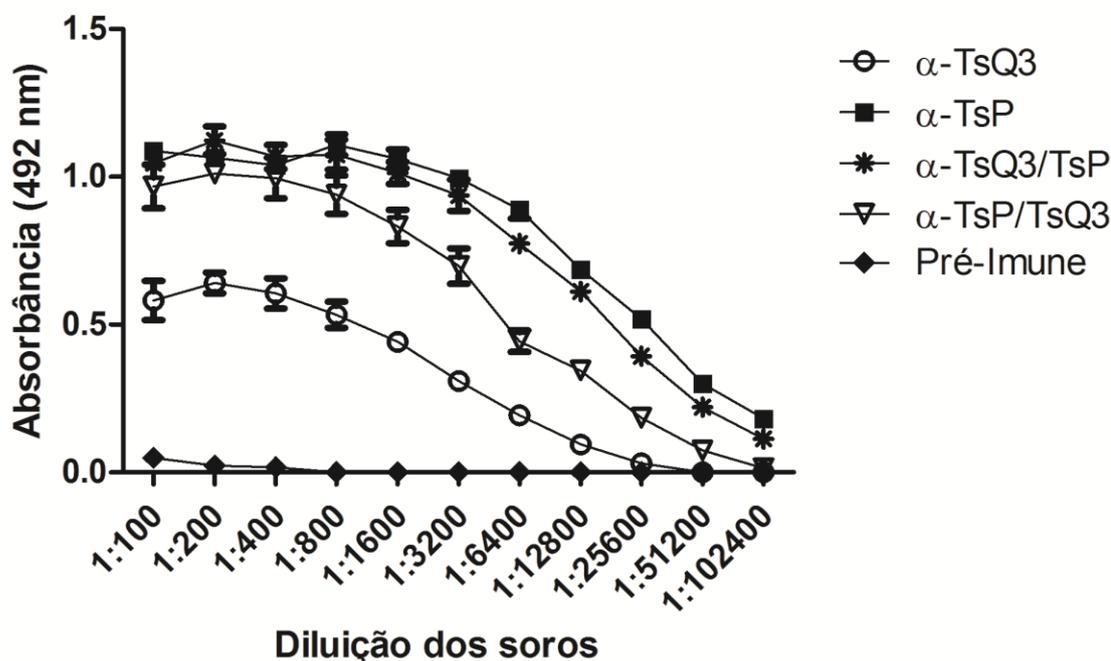
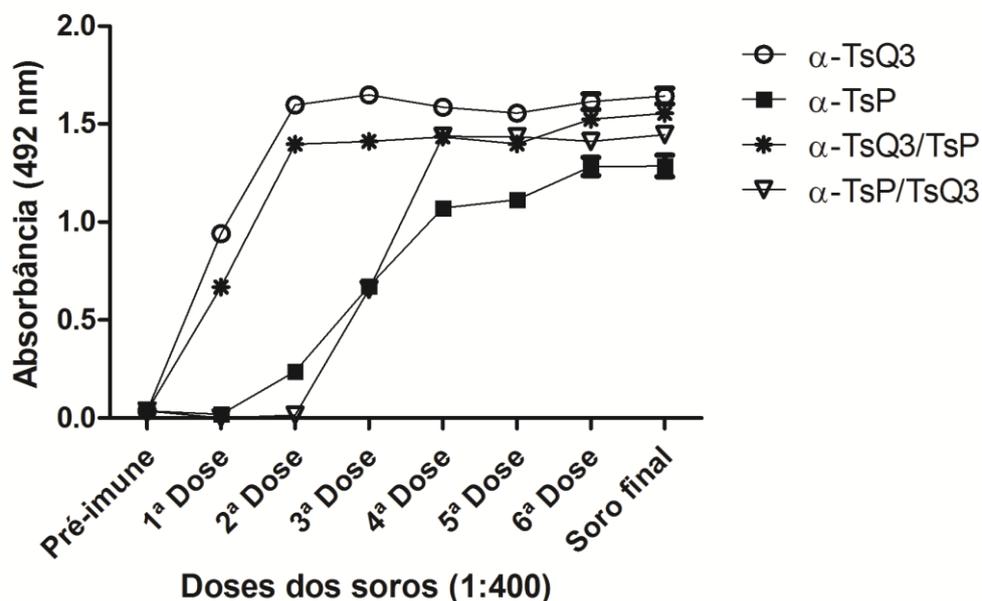


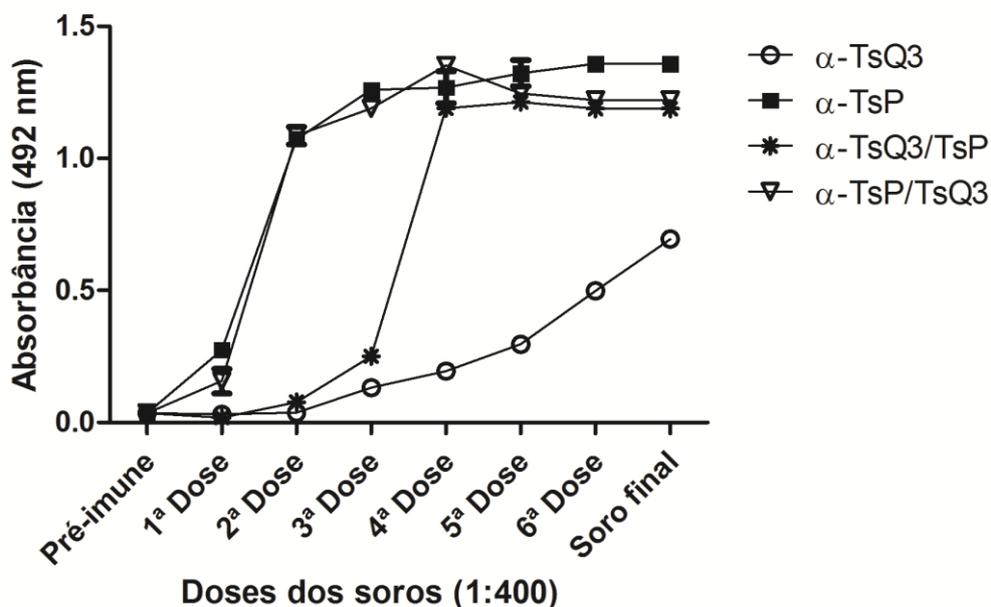
Figura 14: Titulação dos soros produzidos contra TsP e TsQ3.

A placa de ELISA foi sensibilizada com TsQ3 (A) ou TsP (B) (0,5 µg/mL). O gráfico mostra os valores de absorbância a 492 nm obtidos da titulação do soro anti-peçonha de *T. serrulatus* nas diluições 1:100 a 1:102400. Note que os soros produzidos apresentaram grau semelhante de reconhecimento contra ambos os antígenos ligados à placa. No entanto o soro α-TsP apresentou menor reconhecimento contra a TsQ3 assim como o soro α-TsQ3 mostrou menor reconhecimento contra TsP.

### A) Reconhecimento dos soros contra TsQ3 por doses



### B) Reconhecimento dos soros contra TsP por doses



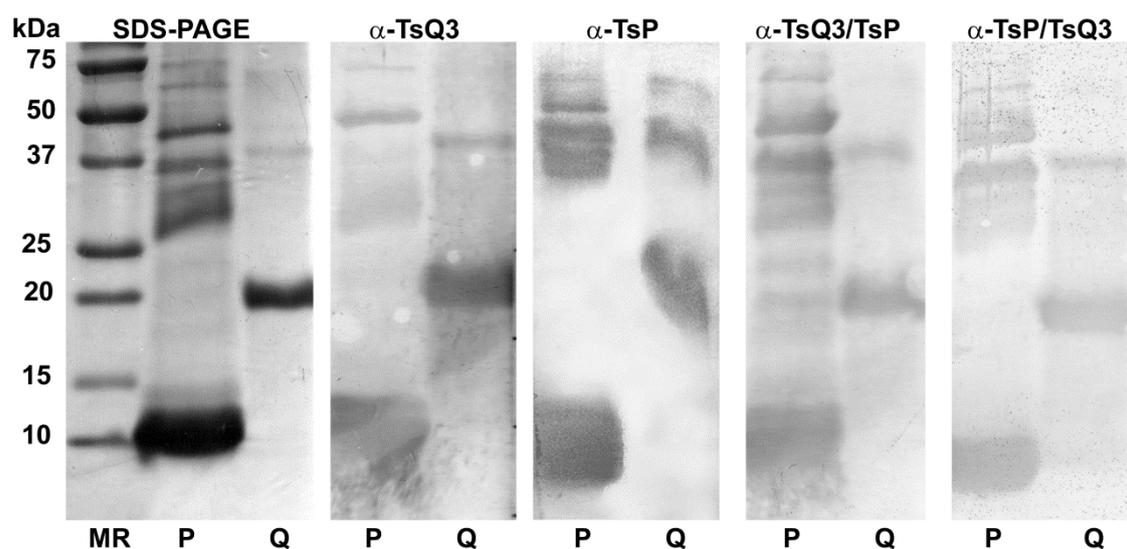
**Figura 15:** Reatividade dos soros  $\alpha$ -TsQ3,  $\alpha$ -TsP,  $\alpha$ -TsQ3/TsP e  $\alpha$ -TsP/TsQ3 contra TsQ3 (A) e TsP (B) em relação as doses de imunização.

As placas de ELISA foram sensibilizadas com TsQ3 (A) e TsP (B) (0,5  $\mu$ g/mL). O gráfico mostra os valores de absorbância a 492 nm obtidos da titulação dos soros  $\alpha$ -TsQ3,  $\alpha$ -TsP,  $\alpha$ -TsQ3/TsP e  $\alpha$ -TsP/TsQ3 na diluição de 1:400. Nota: Os soros finais correspondem a dois ciclos de imunização com seis doses por ciclo, sendo que TsP: peçonha bruta de *T. serrulatus*; TsQ3/TsP (duas doses de TsQ3 seguidas de quatro doses de TsP); TsP/TsQ3 (duas doses de TsP seguidas de 4 doses de TsQ3).

## 5.9 Western Blot

Para o Western Blot, foi utilizado a ultima dose de todos os soros produzidos, ( $\alpha$ -TsQ3,  $\alpha$ -TsP,  $\alpha$ -TsQ3/TsP e  $\alpha$ -TsP/TsQ3). Esse ensaio tem por objetivo verificar o reconhecimento dos soros produzidos contra os antígenos TsQ3 e TsP.

A banda correspondente à TsQ3 foi bem reconhecida por todos os soros utilizados, o que indica que há semelhança de epítomos entre a proteína recombinante e as toxinas presentes na peçonha de *T. serrulatus*. Ao mesmo tempo, a banda de aproximadamente 10 kDa de TsP (P) foi bem reconhecida pelo soro  $\alpha$ -TsQ3, e em menor grau as bandas de alta massa da peçonha. Os soros produzidos com ambos os antígenos reconheceram, bem tanto a peçonha quanto a TsQ3. Observa-se, junto à separação eletroforética de TsQ3, ainda uma banda com massa de aproximadamente 40 kDa, elas podem derivar de um dímero de TsQ3 ou serem provenientes de proteínas bacterianas de alta massa ricas em resíduos de histidina (Figura 16).



**Figura 16: Western Blot com os soros imunes produzidos.**

Western Blot resultante da transferência de um gel SDS-PAGE 15 % a uma membrana de PVDF. As amostras de padrão de massa molecular (M), TsP (P) e TsQ3 (Q) foram aplicadas no gel de SDS-PAGE. O gel foi cortado e uma parte foi corada com Coomassie blue e as outras submetidas à transferência para a membrana de PVDF. É possível visualizar no gel (à esquerda), na eletroforese de peçonha de *T. serrulatus* (P), uma banda difusa com massa de aproximadamente 10 kDa, referente às toxinas principais da peçonha, e algumas bandas de alta massa molecular, relativas a outros componentes da peçonha. Nas membranas (à direita), os soros produzidos, com capacidade de reconhecer a TsP (P) e também a TsQ3 (Q), que possui massa molecular de 22,7 kDa e a banda de alta massa observadas, (aproximadamente 40 kDa).

## 5.10 Soro-neutralização

Os quatro soros imunes produzidos foram capazes de gerar neutralização contra TsP (Tabela 6). O soro  $\alpha$ -TsP utilizado como controle, foi capaz de neutralizar até 2 DL<sub>50</sub> por 100

$\mu\text{L}$  de soro, os camundongos que receberam esse soro não apresentaram nenhum sintoma associado ao envenenamento por TsP. O soro pré-imune foi utilizado como controle negativo desse ensaio e não apresentou capacidade protetora. Os soros  $\alpha\text{-TsQ3/TsP}$  e  $\alpha\text{-TsP/TsQ3}$  apresentaram capacidade de neutralização parcial contra 2  $\text{DL}_{50}$ . Esses soros protegeram 75% e 62,5%, respectivamente. Os camundongos que receberam os soros desses grupos apresentaram sintomas de envenenamento mais brandos do que os animais que receberam o soro pré-imune. Já o soro  $\alpha\text{-TsQ3}$  apresentou capacidade de neutralização parcial de TsP. Esse soro foi capaz de proteger 1  $\text{DL}_{50}$  de TsP e protege parcialmente contra 1,5  $\text{DL}_{50}$  (37,5%), os animais que receberam esse soro também apresentaram sintomas parciais do envenenamento.

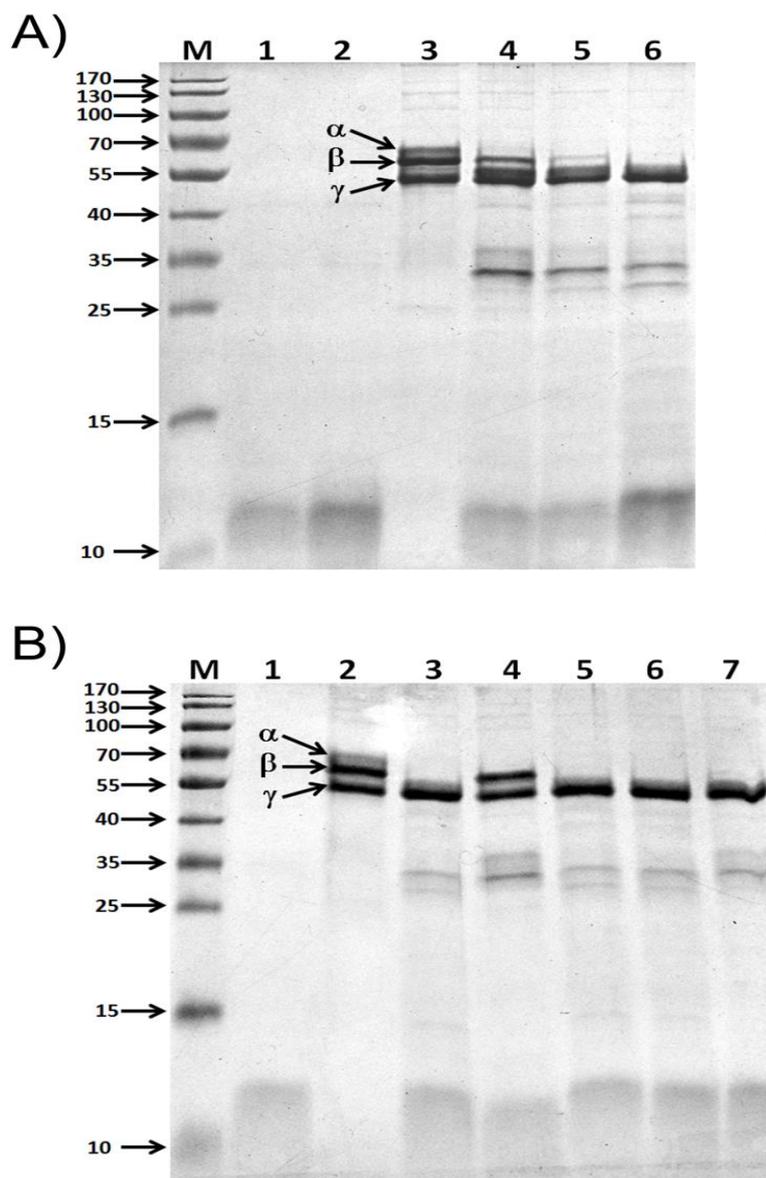
**Tabela 6: Soro neutralização com os soros imunes produzidos. Sobrevivência (n/%) por grupo.**

Dose		Soro imune (100 $\mu\text{L}$ )				
$\text{DL}_{50}$	$\mu\text{g}$ de TsP	$\alpha\text{-TsQ3}$	$\alpha\text{-TsP}$	$\alpha\text{-TsQ3/TsP}$	$\alpha\text{-TsP/TsQ3}$	Pré-Imune
1	22,28	8/100%	8/100%	8/100%	8/100%	4/50%
1,5	33,42	3/37,5%	8/100%	8/100%	8/100%	0/0%
2	44,56	-	8/100%	6/75%	5/62,5%	-

### 5.11 Avaliação da atividade proteolítica de TsP

O ensaio de digestão com a peçonha bruta apresentou clivagem das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio. A TsP foi capaz de clivar parcialmente a cadeia  $\alpha$  em 1 hora, clivou totalmente a cadeia  $\alpha$  e parcialmente a  $\beta$  em 4 horas e clivou totalmente as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  em 16 horas de digestão (Figura 17 A), mostrando que a peçonha de *T. serrulatus* possui atividade fibrinogenolítica.

No ensaio de inibidores de proteases classe específico, a TsP foi incubada com fibrinogênio por 16 horas. Os inibidores EDTA (Metalloproteases), PMSF (Serino proteases), E-64 (Cisteíno proteases) e Pepstatina A (Aspartico proteases) foram acrescentados ao veneno antes da incubação com o substrato. Apenas o EDTA foi capaz de inibir parcialmente o efeito de digestão proteolítica causado pela peçonha, sugerindo que a peçonha de *T. serrulatus* aparenta possuir predominantemente a classe das metaloproteases (Figura 17 B). Não foram testados outros substratos para avaliar a especificidade das proteases, porém outros trabalhos com a peçonha de *T. serrulatus* já utilizaram substratos como gelatina, VAMP-2 e VAMP-8 e fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate peptide Abz-FLRRV-EDD-np, sendo relatada atividade proteolítica (Almeida *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2010; Venancio *et al.*, 2013).



**Figura 17: Ensaio de clivagem do fibrinogênio por TsP.**

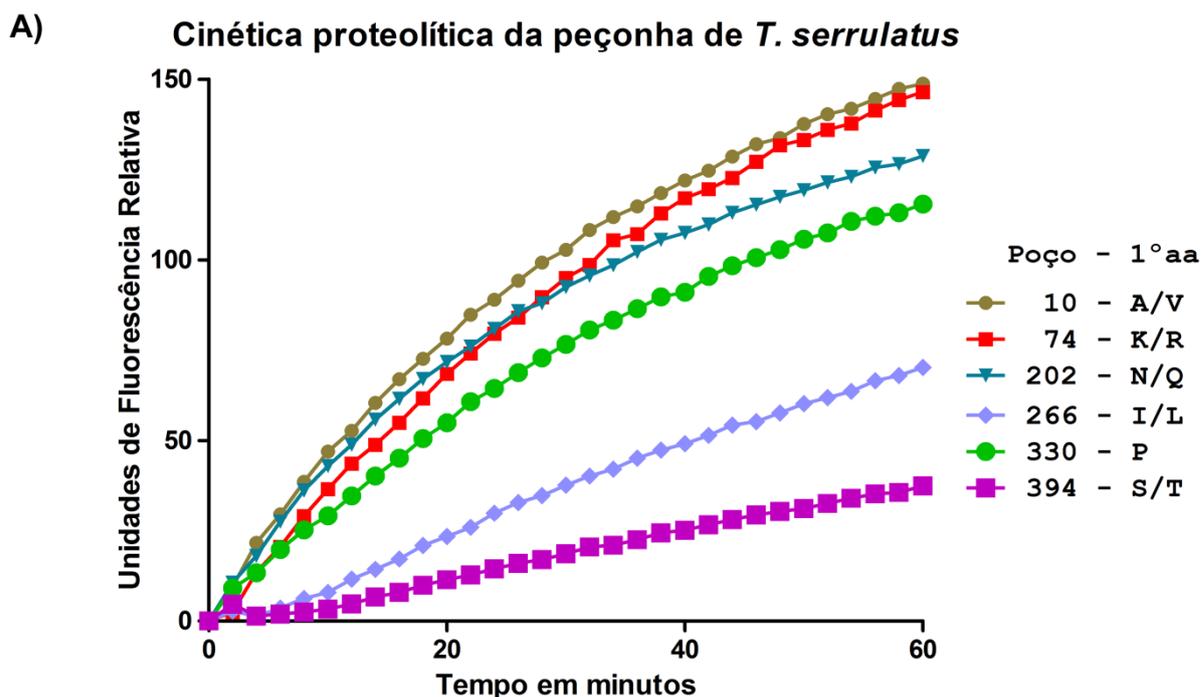
Eletroforese SDS-PAGE em gel de 15%. A avaliação da clivagem proteolítica foi inferida pela visualização da degradação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio. **A)** Foi realizado o ensaio por tempo de incubação. **M)** Marcador de massa molecular, a massa dos marcadores está designada na figura. **1)** 2  $\mu\text{g}$  de TsP; **2)** 3  $\mu\text{g}$  de TsP; **3)** 5  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio, as setas indicam as cadeias  $\alpha$  (63.5 kDa),  $\beta$  (56 kDa), and  $\gamma$  (47 kDa); **4-6)** 5  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio digeridos por 3  $\mu\text{g}$  de TsP durante 1, 4 e 16 horas respectivamente. A banda difusa com baixa massa molecular corresponde às neurotoxinas de TsP, no entanto a quantidade de peçonha aplicada no ensaio não permite a visualização dos componentes de alta massa molecular de TsP. **B)** Inibição da atividade proteolítica de TsP por inibidores de protease classe-específicos. 3  $\mu\text{g}$  de TsP foi incubado por 16 horas com 5  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio juntamente com um inibidor classe-específico de protease. **1)** 3  $\mu\text{g}$  de TsP; **2)** 5  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio, as setas indicam as cadeias  $\alpha$  (63.5 kDa),  $\beta$  (56 kDa), and  $\gamma$  (47 kDa); **3-7)** incubação de 3  $\mu\text{g}$  de TsP e 5  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio; **3)** controle positivo, sem inibidor; **4)** 10 mM de EDTA; **5)** 2 mM de PMSF; **6)** 20  $\mu\text{M}$  de E-64; **7)** 20  $\mu\text{M}$  de pepstatina A.

## 5.12 Identificação dos sítios de clivagem das proteases de TsP

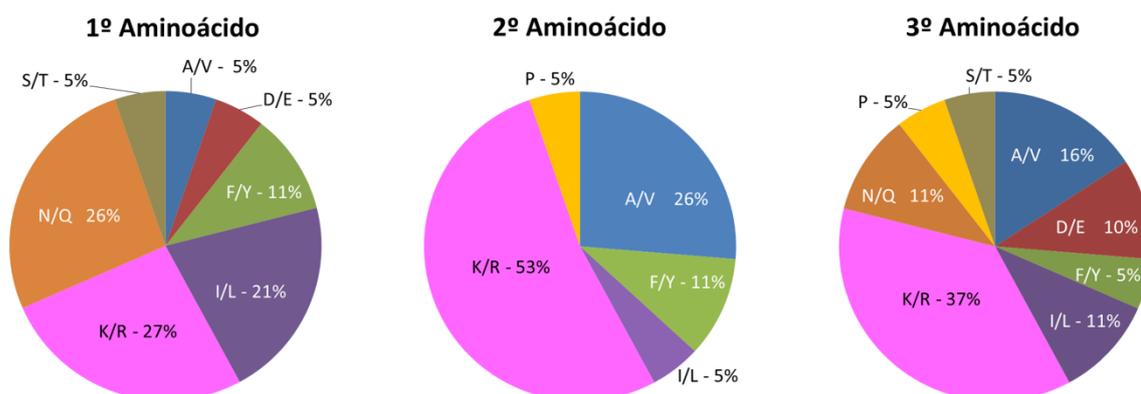
A reação de cinética enzimática para identificação dos sítios de clivagem das proteases presentes na peçonha de *T. serrulatus* identificou apenas seis poços que apresentaram

aumento de fluorescência após incubação de uma hora com TsP (Figura 18). Esses seis poços denominados de 10, 74, 202, 266, 330 e 394 (Referencia do próprio kit) apresentam obrigatoriamente os aminoácidos Lisina e Arginina nas 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> posições. Já o primeiro aminoácido presente na sequência foi variável, podendo ser dividido em relação à intensidade de fluorescência final de cada poço em alta e baixa. Os poços que apresentaram sinal de fluorescência alta possuem aminoácidos hidrofóbicos de cadeia curta (A, V, P) poços 10 e 330, resíduos básicos (K, R) poço 74 ou resíduos polares neutros (N, Q) poço 202. Os poços que apresentaram sinal de fluorescência baixa possuem os resíduos hidrofóbicos de cadeia longa (I, L) poço 266 ou os resíduos polares neutros (S, T) poço 394.

Além dos peptídeos identificados durante o ensaio de cinética proteolítica, outros 20 poços apresentaram aumento de fluorescência após incubação por 48 horas. Nesse caso os peptídeos presentes nos poços apresentam maior variação em relação ao seu caráter químico. O aminoácido que ocupa a primeira posição da trinca apresentou maior diversidade de composição em relação aos demais componentes da trinca. Os resíduos predominantes encontrados na primeira posição foram I/L, K/R, N/Q com 74% do total de resíduos para essa posição. Já a segunda e terceira posições apresentaram menor variação na composição de resíduos, sendo predominante a presença de K ou R com 53% e 37% respectivamente (Figura 18 B). Foi observado que a clivagem proteolítica ocorreu preferencialmente próxima a resíduos básicos, sendo que os aminoácidos K/R estavam presentes em 79% dos peptídeos presentes em poços que apresentaram clivagem secundária. Os resíduos de aminoácidos encontrados nos sítios não específicos de clivagem das proteases de *T. serrulatus* corroboram com os dados encontrados no ensaio de cinética, no qual o 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> aminoácido da trinca eram obrigatoriamente K ou R, mostrando que essas proteases tem preferência de clivagem próximo a resíduos básicos.



**B) Porcentagem da composição de aminoácidos no sítios secundários**



**Figura 18: Sítios primários e secundários de clivagem pelas proteases de TsP.**

A especificidade dos sítios de clivagem das proteases da peçonha de *T. serrulatus* foi testado com o kit REPLi. **A)** O ensaio de cinética de clivagem apresenta os seis poços em que foi observada clivagem efetiva em uma hora de ensaio. Os aminoácidos localizados nas 2ª e 3ª posições para todos os poços reativos foram K ou R, no entanto a 1ª posição apresentou maior variação de composição. **B)** Identificação dos sítios de clivagem secundários com incubação por 48 horas. Os gráficos apresentam a proporção relativa de cada aminoácido em relação a sua posição dentro da trinca de peptídeos testados.

## 5.13 RNA-Seq da glândula de peçonha

### 5.13.1 Extração do RNA da glândula de peçonha

O RNA total extraído de cada um dos quatro grupos experimentais apresentou bom rendimento e grau de pureza conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Concentração e grau de pureza do RNA extraído.

Biblioteca	Concentração ng/ $\mu$ L	Razão 260/280	Razão 260/230
G0	650	2,07	2,10
G2	720	2,09	2,04
G4	580	2,11	2,00
G8	830	2,11	1,97

As amostras de RNA das bibliotecas ainda apresentam boa qualidade sem sinais marcantes de degradação. A análise de qualidade foi inferida através de um gel de agarose 1,5 %, no qual foram aplicadas as amostras de cada um dos quatro grupos. Além disso, foi aplicado no gel amostras que não foram ligadas as beads-Oligo(dt) magnéticas durante o processo de purificação do mRNA (Figura 19).

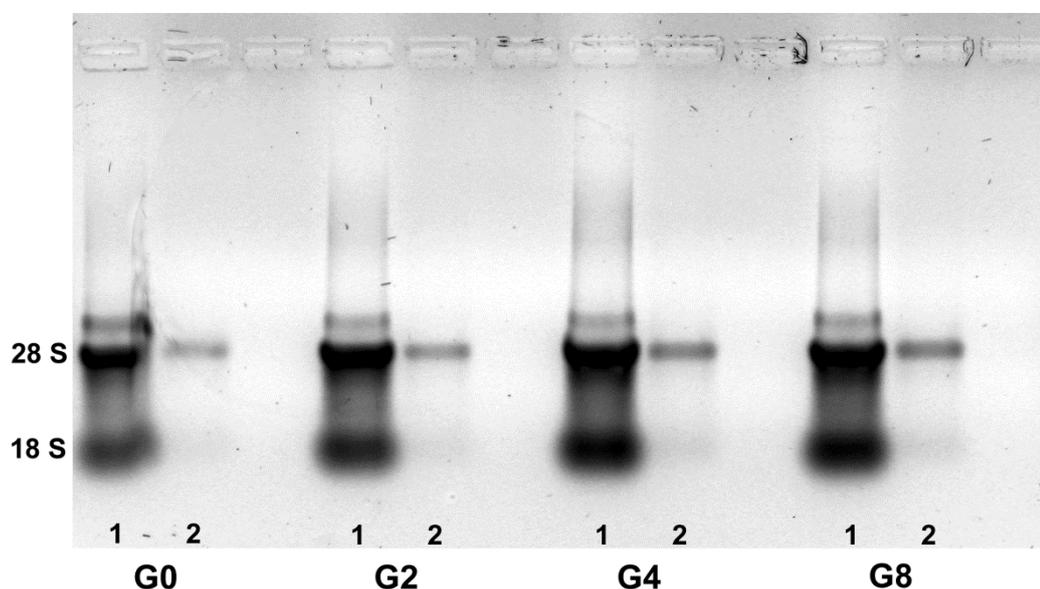


Figura 19: Gel de agarose 2 % das amostras de RNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus*.

Eletroforese em agarose apresentando a qualidade do RNA total extraído a partir de quatro grupos (10 escorpões por grupo) submetidos a diferentes tempos de extração de peçonha previamente a extração de RNA. Os grupos são sinalizados por G0, G2, G4 e G8, o número corresponde ao intervalo entre extração de peçonha e extração de RNA total. No grupo G0 não houve extração de peçonha prévia. (1) amostra de RNA não purificada. (2) amostra de RNA que não se ligou as beads-Oligo(dt).

### 5.13.2 Construção da biblioteca e sequenciamento de nova geração

A primeira biblioteca de cDNA glândula de peçonha foi montada por Kalapothakis *et al.*, (2001) e foi sequenciada com sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems) por Alvarenga *et al.* (2012).

As quatro bibliotecas foram construídas conforme instruções do kit “TruSeq sample prep” (Illumina). A partir de 1  $\mu$ g de RNA total apresentaram boa qualidade e concentração satisfatória para serem sequenciados no MiSeq Illumina. As bibliotecas apresentaram

concentração média de 180 nM (concentração de fragmentos da biblioteca de cDNA) sendo posteriormente diluídas para 15 pM para serem utilizadas no sequenciamento.

O sequenciamento apresentou um rendimento total de 16,7 gb de dados, com 30.280.186 de *reads* paired-end (cada *read* é formada pela sequência R1 e R2), destas 27.150.888 (98,49%) passaram pelo filtro de qualidade do próprio sequenciador. Mais de 75% das *reads* geradas apresentam ótima qualidade com valor de qualidade de Phred (probabilidade de erro na sequência) maior que Q30. Os 200 primeiros nucleotídeos de cada *read* apresentaram melhor qualidade em ambas as leituras R1 e R2 (direta e reversa, respectivamente).

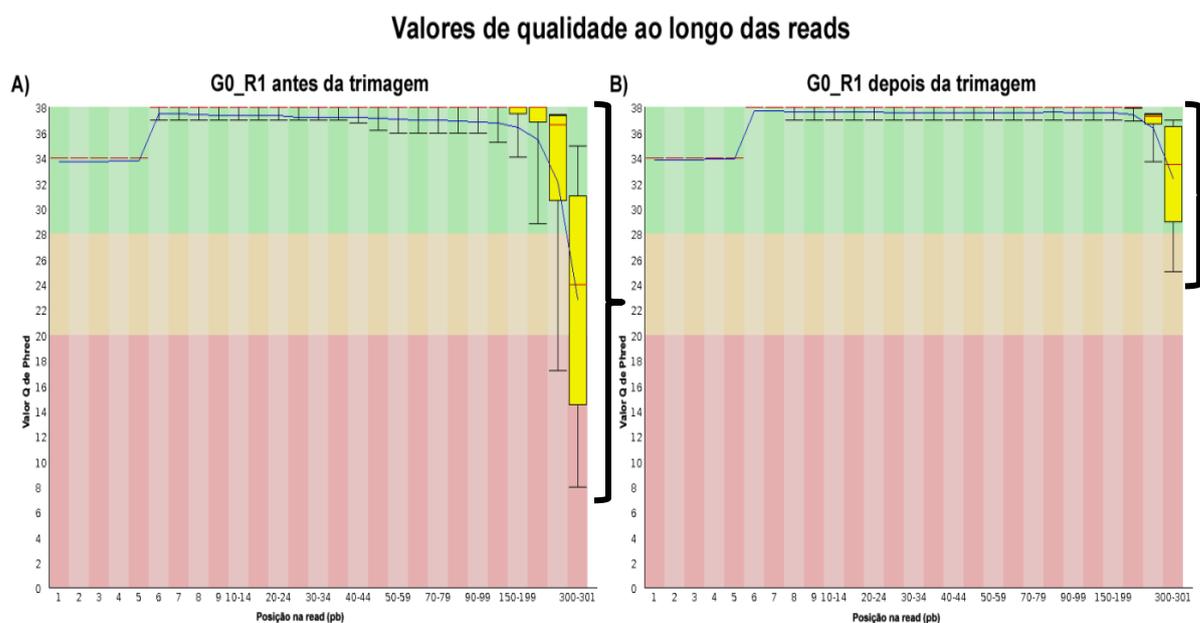
As bibliotecas apresentaram distribuição das sequências homogênea, sendo que G0, G2, G4 e G8 apresentaram respectivamente 25,87%, 25,00%, 25,76% e 21,86% das *reads* totais do sequenciamento.

### 5.13.3 Trimagem das sequências

Devido à boa qualidade do sequenciamento 23,19 % de bases sequenciadas foram excluídas das *reads* finais (Tabela 8). As bases excluídas dessas *reads* se localizaram principalmente nos arquivos de R2 (sequenciamento reverso) após a base de posição 200 de cada *read*. Ao todo foram eliminadas 10,05% de todas as *reads* sequenciadas, dentre elas estão as *reads* com tamanho inferior a 40 pb e sequências que não possuem qualidade superior a Q20 em toda a extensão da *read* (Figura 20).

**Tabela 8: Reads geradas pelo sequenciamento antes e após trimagem por tamanho e qualidade.**

<i>Arquivo</i>	<i>Antes da trimagem</i>		<i>Depois da trimagem</i>		<i>% de reads trimadas</i>	<i>% de bases trimadas</i>
	<b>Reads</b>	<b>Bases</b>	<b>Reads</b>	<b>Bases</b>		
G0_R1	7.131.997	1.477.970.544	6.682.312	1.265.111.149	6,31	14,40
G0_R2	7.131.997	1.502.817.404	6.173.675	1.037.721.024	13,44	30,95
G2_R1	6.891.084	1.471.119.761	6.480.974	1.267.528.772	5,95	13,84
G2_R2	6.891.084	1.493.261.064	5.971.725	1.035.180.040	13,34	30,68
G4_R1	7.100.936	1.587.488.569	6.674.057	1.356.792.885	6,01	14,53
G4_R2	7.100.936	1.611.999.227	6.040.475	1.066.201.716	14,93	33,86
G8_R1	6.026.871	1.315.686.837	5.656.557	1.127.129.933	6,14	14,33
G8_R2	6.026.871	1.334.395.380	5.163.679	903.577.233	14,32	32,29
<b>Total</b>	<b>54.301.776</b>	<b>11.794.738.786</b>	<b>48.843.454</b>	<b>9.059.242.752</b>	<b>10,05</b>	<b>23,19</b>



**Figura 20: Valores de qualidade Q de Phred por base ao longo das reads.**

Após o sequenciamento as bibliotecas foram analisadas quanto a qualidade das *reads* pelo programa FastQC. Os gráficos apresentados mostram o valor médio de qualidade das bases ao longo das *reads*. **A)** Análise de qualidade realizada após o sequenciamento para a biblioteca G0\_R1. **B)** Análise de qualidade realizada após a trimagem dos dados para a biblioteca G0\_R1. É notada que apenas as bases no fim das *reads* apresentam menor qualidade, após a trimagem nenhuma base apresenta valor Q de Phred menor que Q20 (indicado na figura pelas chaves).

### 5.13.4 Montagem dos *contigs*

As sequências geradas pela biblioteca produzida por Kalapothakis *et al.* (2001) foram identificadas por Alvarenga *et al.* (2012). Os clones identificados nesse trabalho com similaridades a proteases foram sequenciados novamente para se obter a sequência completa. Após o sequenciamento as sequências foram agrupadas em *contigs* pelo programa CodonCode Aligner 4.0. O consenso obtido foi utilizado para identificação e classificação das sequências. Assim, apenas os clones previamente classificados como proteases foram utilizados, sendo 36 clones com similaridade a proteases nessa biblioteca. Esses clones foram agrupados em 10 sequências únicas (5 *contigs* e 5 *singles*).

As *reads* geradas pelo sequenciamento no MiSeq foram montadas em *contigs* pelo programa Trinity. Em média cada biblioteca apresentou 70.000 *contigs*. Esse número grande de *contigs* encontrado nessa montagem pode ser devido à presença de várias isoformas e genes com splicing alternativo, fazendo com que um único locus possa ser representado várias vezes. Como exemplo, o *contig* nomeado c11972\_g1\_i17 da biblioteca G2 apresentou 17 isoformas ou splicing alternativo, demonstrando a alta sensibilidade desse programa para a montagem de sequências de RNA-Seq.

### 5.13.5 Identificação dos *contigs* com similaridades a proteases

Com base nas sequências identificadas por Alvarenga *et al.* (2012), dentre os 1629 clones sequenciados 36 apresentaram similaridades com proteases, totalizando 2,2 % da biblioteca. Assim esses diferentes clones foram agrupados em 10 sequências únicas. Esses *contigs* foram identificados com a ferramenta Blastx contra o banco de dados de proteínas não redundante. Todas essas sequências pertencem à classe das metaloproteases dependentes de zinco. Essas proteases foram denominadas de MetalloSerrulases (TsMS) e receberam um número. As TsMS's 1-9 foram classificadas como pertencentes a família Metzincim enquanto a TsMS 10 pertence a família Gluzincin de metaloproteases dependentes de zinco (Carmo *et al.*, 2014). Após os resultados com o sequenciamento de nova geração, foram identificadas as sequências completas de todas as TsMS.

Os *contigs* obtidos pelo programa Trinity foram avaliados quanto a sua similaridade por sequências relativas a proteases de artrópodes com o auxílio do programa BLASTx-Standalone. Devido a grande quantidade de *contigs* que apresentaram similaridade foi realizada uma filtragem dos dados. O primeiro filtro foi o tamanho do alinhamento, no qual alinhamentos menores do que 100 aminoácidos foram descartados. Após isso, foi utilizado o filtro de similaridade, no qual *contigs* com menos de 70% de similaridade também foram excluídos da análise. O último filtro foi a retirada de *contigs* com resultados duplicados, se mantendo sempre os *contigs* que apresentaram maior valor de similaridade.

Assim, foram identificados nas quatro bibliotecas 57 *contigs* com similaridade a proteases. No entanto, devido a sensibilidade do programa Trinity na montagem dos dados, foram identificados *contigs* contendo sequências idênticas, ou com mutações nas regiões 3' e 5' UTR. Por esse motivo, 34 sequências únicas foram identificadas dentre as 57 iniciais.

Esses *contigs* foram submetidos novamente a análise de similaridade com o programa online Blastx contra o banco de dados não redundante. Todos os *contigs* submetidos a essa análise apresentaram similaridade a alguma protease descrita. Dessas proteases identificadas, 12 apresentam similaridade com proteases potencialmente presentes na peçonha (Tabela 9) (Anexo II). Foram identificadas as 10 sequências de metalloserrulases descritas por Carmo *et al.* (2014), uma sequência com similaridade a serino proteases, e uma nova metaloprotease nomeada de TsMS 11 similar as proteases ADAM 17. A serino protease encontrada possui domínio similar a Tripsina-like proteases, recebendo o nome de TsSP 1 (*T. serrulatus* serino

protease 1), porém essa sequência não foi encontrada de maneira completa, faltando uma parte de seu N-terminal.

As outras 22 proteases identificadas no RNA-Seq sequenciado no MiSeq possuem similaridade a proteases que participam do metabolismo celular, como degradação de proteínas no citoplasma, metabolismo de divisão celular, e componentes vesiculares. Foi identificada uma metaloprotease similar a de matriz extracelular. Cinco subunidades do complexo proteossômico 26S, (subunidades 4, 6A, 6B, 7 e 8), esse complexo completo possui cerca de 2 a 5 MDa. Uma cisteína protease identificada como ‘Cathepsin L-like cysteine peptidase 3’ (HG710156.1), já descrita para essa espécie e com sequência disponível no GenBank. Três serino proteases que também já haviam sido descritas com sequência disponível ‘CUB and LDL domains-containing trypsin-like serine peptidase 1, 2 e 3’ (HG710166.1, HG710167.1 e HG710168.1 respectivamente). Três proteases com similaridades a furinas, (proteases com função de processamento pós transcricional), duas Kyphoscoliosis peptidases, que atuam durante a divisão celular, duas proteases da família Lon, sendo uma delas predita para a localização no peroxossomo. Além dessas, foram identificadas uma metalloprotease, uma Clp protease, uma peptidase caseinolítica, uma cathepsina e uma subunidade de uma protease Clp.

As proteases que são preditas como pertencentes ao metabolismo celular não serão descritas nesse trabalho.

**Tabela 9: Identificação das proteases presentes na peçonha e número de acesso ao GenBank.**

<i>Nomeação da Protease</i>	<i>Nº de acesso GenBank</i>
Metalloserrulase 1 (TsMS 1)	KM115016
Metalloserrulase 2 (TsMS 2)	KM115017
Metalloserrulase 3 (TsMS 3)	KM115018
Metalloserrulase 4 (TsMS 4)	KM115019
Metalloserrulase 5 (TsMS 5)	KM115020
Metalloserrulase 6 (TsMS 6)	KM115021
Metalloserrulase 7 (TsMS 7)	KM115022
Metalloserrulase 8 (TsMS 8)	KM115023
Metalloserrulase 9 (TsMS 9)	KM115024
Metalloserrulase 10 (TsMS 10)	KM115025
Metalloserrulase 11 (TsMS 11)	-
Ts Serine protease 1 (TsSP 1)	-
<b>Total</b>	<b>12</b>

### 5.13.6 Identificação de domínios e similaridade

As sequências proteicas de todas as bibliotecas com identidade a proteases foram submetidas aos programas SignalP 4.1, ProP 1.0 e BlastP para a identificação de peptídeo sinal, propeptídeo e domínios.

Todas as TsMS's encontradas nas bibliotecas de NGS apresentaram em suas sequências proteicas as regiões de peptídeo sinal e propeptídeo. As TsMS's 1-9 apresentam maior similaridade entre si por se tratarem de proteases pertencentes a mesma família (Figura 21).

As TsMS 1-9 apresentaram a região conservada H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-D que inclui o sítio ativo e o sítio de ligação ao Zn, indicando que essas proteases pertencem a classe das metaloproteases. Após o primeiro resíduo de histidina do sítio ativo é encontrado um resíduo conservado de metionina a cerca de 25-35 aminoácidos. Essa metionina está localizada em um alça hidrofóbica que direciona esse resíduo ao sítio catalítico. A presença desse aminoácido auxilia na estabilização do átomo de Zn no sítio ativo, sendo comumente encontrada dentro da família de metaloproteases Metzincin (Bode *et al.*, 1993; Hooper, 1994; Seals & Courtneidge, 2003). O sítio catalítico descrito acima apresenta um resíduo de glicina conservado, no entanto a TsMS 3 possui uma substituição desse resíduo por uma alanina (posição 354, Figura 21), que provavelmente não deve apresentar influência significativa em sua função catalítica.

A protease TsMS 10 apresenta um sítio catalítico diferente das demais TsMS's. Esse sítio é descontínuo (N-A/V-x-x-H-E-x-x-H/E-x-x-x-D/Y-A/H-x-x-x-x-x-R), indicando que a conformação tridimensional é extremamente importante para a estabilização do átomo de Zn e função dessa enzima. De acordo com o alinhamento realizado com o programa Blastp essa enzima possui alta similaridade as proteases pertencentes à família Gluzincin (Rawlings & Barrett, 1995; Fernandez *et al.*, 2001).

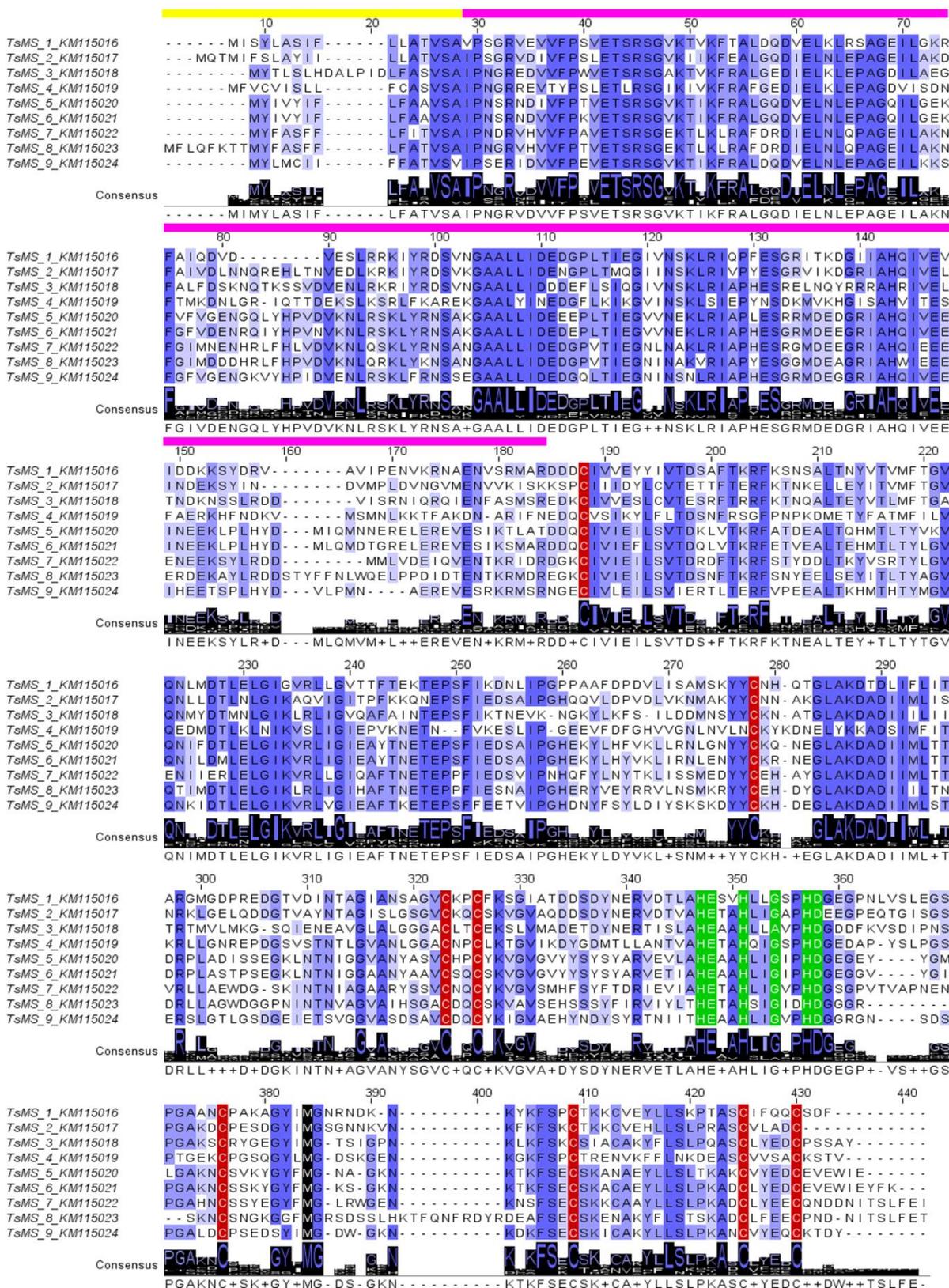


Figura 21: Alinhamento entre as seqüências proteicas das TsMS 1-9.

Alinhamento exibindo a similaridade entre as seqüências das TsMS 1-9. A cor azul mais forte simboliza maior conservação das seqüências. A linha horizontal amarela simboliza o peptídeo sinal. A linha horizontal rosa simboliza o propeptídeo. Os oito resíduos de cisteínas, que possivelmente formam quatro pontes dissulfeto, estão marcados de vermelho. O sítio ativo formado pelo domínio H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-D está marcado em verde. O resíduo de metionina localizado na alça hidrofóbica que ajuda a estabilizar o átomo de Zn está marcado de preto. A seqüência consenso entre essas próteses está marcada abaixo.

A protease TsMS 11 (Anexos II) foi identificada apenas no sequenciamento de nova geração. Essa protease apresenta o mesmo sítio catalítico que as TsMS 1-9, H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H-D, o resíduo de metionina na posição 29 após a primeira histidina do sítio catalítico (Bode *et al.*, 1993; Hooper, 1994; Seals & Courtneidge, 2003). Além do mesmo domínio catalítico essa protease apresenta peptídeo sinal e propetídeo antecessor ao domínio proteolítico. Diferente das outras TsMS's, a TsMS 11 apresenta mais dois domínios após o sítio catalítico. O domínio de desintegrina tem função relatada de impedir a ligação, nos receptores de integrina, de seus ligantes, contribuindo para processos anticoagulantes descritos para peçonhas de serpentes (Calvete, 2013). Essa metalloserrulase também possui o domínio de membrana próxima, posterior ao domínio de desintegrina, que faz com que essa protease possa se ancorar na membrana celular para exercer sua função. Essa configuração molecular é encontrada nas proteases da família ADAM (*A Desintegrin And Metalloprotease*). Essas proteases se localizam na membrana celular e desempenham vários processos (Calvete, 2013).

A serino protease encontrada, nomeada de TsSP 1 (Anexos II) foi identificada como pertencente a família das tripsinas-like. Essas proteases são bem descritas e relacionadas a vários processos biológicos, com preferência por clivar sítios formados por resíduos básicos (Rypniewski *et al.*, 1994; Perona & Craik, 1995)

As demais proteases que foram identificadas nas quatro bibliotecas pelo sequenciamento de nova geração, são preditas como componentes de metabolismo celular e extracelular do tecido da glândula de peçonha de *T. serrulatus*. Como o objetivo desse trabalho foi à busca por novos componentes da peçonha desse escorpião, essas novas sequências não foram caracterizadas a um nível elevado.

As sequências de cDNA correspondentes a possíveis proteases da peçonha de *T. serrulatus* identificadas nesse trabalho foram alinhadas com o auxílio do programa MEGA 5 para inferência de suas relações filogenéticas.

O ponto isoelétrico e a massa molecular das proteases identificadas nesse trabalho foi averiguado com a ferramenta “Compute pI/Mw” do servidor ExPASy. Os valores encontrados para as proteínas completas e maduras estão na Tabela 10. Todas as proteases apresentam caráter ácido, com ponto isoelétrico menor que 7, com exceção a TsMS 11 que possui esse parâmetro levemente básico. As TsMS 1-9 apresentam massa molecular em média de 26 kDa, na forma madura, já as TsMS 10-11 apresentam massa maior, com cerca de 56 e 68 kDa

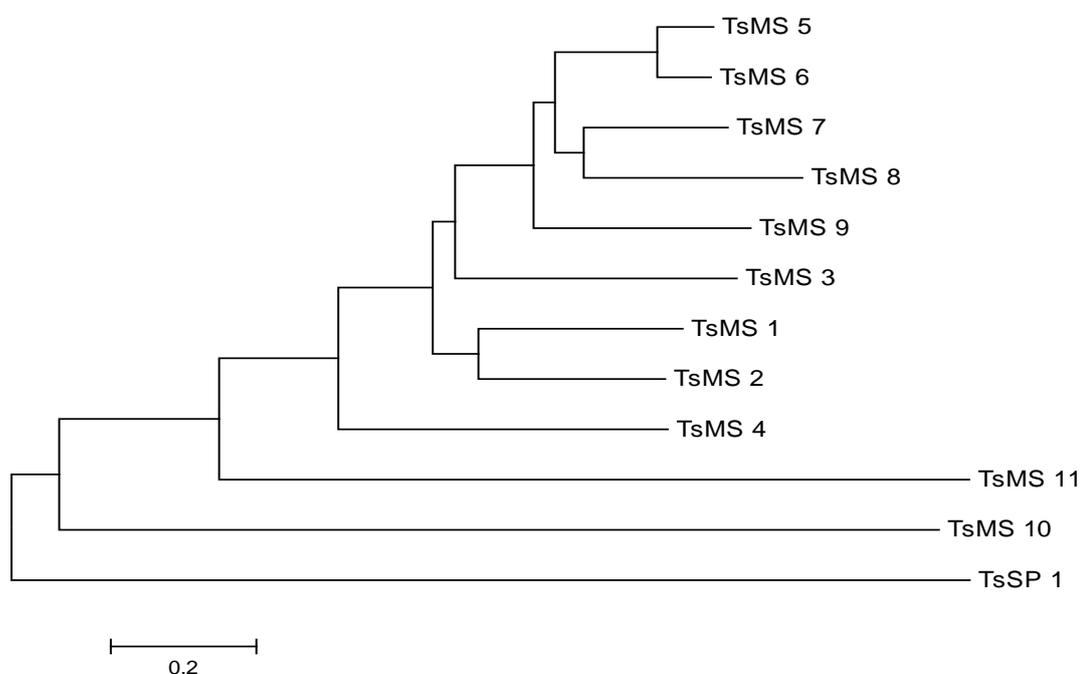
respectivamente. Como não foi encontrada a sequência completa da TsSP 1, não é possível a identificação do correto ponto isoelétrico e massa molecular dessa protease.

**Tabela 10: Ponto isoelétrico e massa molecular das proteases da peçonha de *T. serrulatus*.**

<i>Protease</i>	<i>Completa</i>		<i>Madura</i>	
	<b>P.I.</b>	<b>M.R.</b>	<b>P.I.</b>	<b>M.R.</b>
TsMS 1	5,34	42960,9	4,88	25637,95
TsMS 2	5,26	44054,58	5,42	25640,19
TsMS 3	5,68	45048,4	5,47	25921,84
TsMS 4	7,03	44148,57	5,18	25671,11
TsMS 5	5,14	45217,53	5,27	26237,83
TsMS 6	5,2	45481,76	5,11	26475,05
TsMS 7	4,94	46107,02	4,85	27570,07
TsMS 8	5,12	47959,72	5,18	27530,66
TsMS 9	4,9	44316,84	4,78	25808,87
TsMS 10	5,33	97836,73	4,87	55940,23
TsMS 11	7,47	92436,48	7,5	68168,05
TsSP 1	-	-	4,69	39154,79

P.I. Ponto Isoelétrico; M.M. Massa Relativa.

A árvore filogenética formada pelas proteases presentes na peçonha de *T. serrulatus* apresentou coesão entre as TsMS 1-9. Com maior distanciamento das demais. Por se tratar de outra classe de proteases a TsSP 1 ficou agrupada como grupo externo no cladograma (Figura 22).



**Figura 22: Arvore filogenética com as sequências das proteases presentes da peçonha de *T. serrulatus*.**

Arvore filogenética apresentando as relações de similaridade entre as sequencias das proteases presentes na peçonha de *T. serrulatus*. As proteases TsMS 11, TsMS 10 e TsSP 1 se localizam mais externamente ao grupo, pois essas proteases estão presentes em outras classes de proteases, metaloproteases ADAM 17, Gluzincin e serino protease Tripsina-like respectivamente.

## 6. Discussão

O estudo de peçonhas animais teve início há muitos anos, e o primeiro passo para tal é a obtenção da peçonha. A peçonha escorpiônica era inicialmente obtida a partir da retirada do télson dos animais seguida de maceração e centrifugação (Todd, 1909). Esse processo foi se aperfeiçoando, e atualmente a maneira mais utilizada para a extração de peçonha escorpiônica é a estimulação elétrica. Esse processo induz contração nos músculos que envolvem a glândula promovendo a expulsão da peçonha.

No presente trabalho, a extração da peçonha de *T. serrulatus* foi realizada por estimulação elétrica e apresentou uma queda de rendimento ao longo das extrações. Esse fato pode ser devido ao intervalo de tempo entre as extrações, manutenção dos animais em cativeiro ou injúria causada pela estimulação elétrica. Outros trabalhos observaram o mesmo padrão de decréscimo no rendimento de peçonha por extrações sucessivas em aranhas e escorpiões. Rocha-e-Silva *et al.* (2009) caracterizaram parcialmente a peçonha da aranha *Vitalius dubius* e observaram o mesmo decréscimo de rendimento entre as extrações, mesmo com intervalos de até 90 dias, corroborando a hipótese de interferência de fatores externos envolvidos na produção de peçonha. Após a extração de peçonha, há um alto custo metabólico para a recuperação da mesma. Em *Parabuthus transvaalicus* cuja peçonha foi extraída, o metabolismo aumentou 39% em relação a escorpiões não estimulados. O período de 72 horas após a extração não foi suficiente para a total síntese de peçonha, sugerindo mais uma vez que outros fatores estão envolvidos na recuperação total do rendimento proteico da peçonha (Nisani *et al.*, 2007). A falta de tempo ou condições adequadas suficientes para que o escorpião restaure os estoques de peçonha entre extrações culmina em baixo rendimento de extrações subsequentes. Escorpiões são animais predadores e utilizam sua peçonha para a captura de presas e defesa. Assim os estoques de peçonha sempre devem estar abastecidos, mesmo após uma refeição, devido a uma eventual necessidade de defesa. Em ambiente natural esses animais podem se alimentar a cada 15 dias, mas podem permanecer por mais de um ano sem alimento dependendo da escassez de alimentos (Dados não apresentados). Porém, os escorpiões mantidos em laboratórios tem sua dieta controlada, o que garante que eles não necessitem permanecerem longos períodos sem comida. Além disso, a constante manipulação (limpeza dos terrários, extração de peçonha e etc.) e o próprio *stress* causado pelo choque nas extrações de peçonha fazem com que eles alterem sua fisiologia e pode levar a uma diminuição da produção de peçonha. Nisani *et al.* (2012) mostraram que, apesar do menor

rendimento bruto, as peçonhas de *P. transvaalicus* extraídas apresentaram toxicidade similar após diversas extrações, sugerindo que não há alteração na razão produção de cada toxina, o que incentiva a manutenção desses animais em laboratório.

A construção de proteínas quiméricas com várias sequências diferentes em tandem já vem sendo utilizada para diversos fins, como indução de resposta imunológica (Legros *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Marcos *et al.*, 2013), caracterização de toxinas que agem em canais iônicos ou canais iônicos quiméricos (Bouhaouala-Zahar, 2002; Legros *et al.*, 2007), desenvolvimento de moléculas bioativas (Drakopoulou *et al.* 1996; Pimentel *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2011) ou construção de anticorpos recombinantes (Selisko *et al.*, 2004; Hmila *et al.*, 2008).

O primeiro trabalho descrito com um antígeno quimérico de peçonha escorpiônica utilizou as sequências de duas  $\alpha$ -toxinas do escorpião *Androctonus australis*, AaH1 e AaH2, e foi expresso fusionado à MBP. Tal antígeno foi reconhecido apenas pelo soro anti-AaH2, no entanto não foi produzido um soro anti-quimera nesse trabalho. Por outro lado, a imunização de coelhos com três toxinas recombinantes isoladas (AaH1, AaH2 e AaH3) aplicadas em conjunto no mesmo animal produziu soro com boa capacidade neutralizante contra os efeitos letais da fração tóxica da peçonha (Legros *et al.*, 2001).

Com relação a outras toxinas, a quimera proposta por Wang *et al.* (2012) possui sequências relativas a duas toxinas, TcdA e TcdB, de *Clostridium difficile*. Nesse trabalho, foi obtido um ótimo resultado na neutralização e proteção de animais desafiados com cepas virulentas dessa bactéria. Assim, os autores propõem que a quimera poderia ser utilizada como uma vacina para prevenção da infecção por esse patógeno. Demais trabalhos utilizando antígenos quiméricos contra os vírus de sarampo e dengue, demonstraram que os antígenos quiméricos foram capazes de estimular a produção de anticorpos com satisfatório potencial protetor (Wu *et al.*, 2013; Marcos *et al.*, 2013). Mendes *et al.* (2013) construíram uma proteína quimérica com três epítopos da toxina LiD1 da peçonha da aranha *Loxosceles intermedia*. Anticorpos gerados em coelhos contra essa quimera foram capazes de neutralizar de forma significativa os efeitos dermonecróticos e hemorrágicos causados pela proteína LiD1 recombinante. Sendo assim, há perspectivas favoráveis à utilização de proteínas quiméricas como imunógenos para a produção de diversos soros anti-toxinas ou anti-peçonhas.

Ao se construir um cassete de expressão, cada proteína heteróloga pode se comportar de uma maneira distinta em relação a vários parâmetros, como ausência/presença de

expressão, solubilidade da proteína recombinante, rendimento de cultura e toxicidade às células hospedeiras. Assim, a expressão individual de vários antígenos para o uso em conjunto pode representar um problema de produção, pois será necessária a padronização de expressão de vários protocolos otimizados para cada construção (Weickert *et al.*, 1996; Makino *et al.*, 2011). Esse fato faz com que seja interessante a criação de uma proteína quimérica que possua várias sequências de diferentes toxinas em uma única molécula de proteína. Dessa maneira, a construção desse tipo de proteína poderá simplificar o protocolo de expressão heteróloga, uma vez que apenas uma proteína, com várias sequências, será expressa e purificada.

Por esses motivos a construção de uma proteína quimérica faz os processos de produção da proteína recombinante e imunização sejam mais simples, devido ao uso de uma única sequência. Além disso, o antígeno formado por uma quimera possui diversas sequências de alvos já estudados, aumentando a chance de gerar uma resposta protetora maior contra a peçonha total.

Na tentativa de se obter um soro com capacidade neutralizante contra a peçonha bruta de *T. serrulatus*, causando o mínimo possível de injúrias e sofrimento aos animais imunizados, foi desenvolvida uma proteína quimérica recombinante com sequências de três peptídeos da peçonha bruta: duas toxinas que atuam em canais para sódio dependente de voltagem, uma  $\alpha$  (Ts3), uma  $\beta$  (Ts1) e um peptídeo imunogênico não tóxico a mamíferos, que possui homologia a essa classe de toxinas que agem em canais para sódio (TsNTxP). A construção da proteína quimérica de *T. serrulatus* foi denominada TsQ3 (três sequências em tandem: Ts3-Ts1-TsNTxP) no vetor pET26b.

Uma vez expressa, a TsQ3 se apresentou na forma insolúvel em corpos de inclusão na bactéria hospedeira. A formação desses agregados é muito comum na expressão de proteínas exógenas por *E. coli*, devido a vários fatores, como temperatura, grau de hidrofobicidade da proteína, quantidade de proteínas expressas e incapacidade de formar a estrutura terciária da proteína (Gatti-Lafranconi *et al.*, 2011). Como a TsQ3 é rica em cisteínas, pontes dissulfeto aleatórias podem ter sido formadas dentro da estrutura da quimera e entre moléculas adjacentes. O tratamento por sulfitólise, que quebra essas pontes (Crankshaw & Grant, 2001; Esipov *et al.*, 2012), foi suficiente para solubilizar a TsQ3, o que favoreceu o uso dessa quimera no processo de imunização, mesmo com a perda da estrutura terciária individual de cada toxina, já prevista na estrutura em tandem. A sulfitólise é utilizada em alguns processos de produção de proteínas recombinantes a partir de corpos de inclusão, como a insulina, que

passa por essa fase de desnaturação e segue pra um protocolo de renaturação para que adquira a conformação nativa (Guo *et al.*, 1992). Outro ponto interessante é que o processo de purificação e tratamento de sulfitólise aconteceu junto à resina de purificação. Uma vez que a TsQ3 foi ligada à resina His-Link, de maneira desnaturante, foi possível o tratamento por sulfitólise, retirada da ureia e posterior eluição da proteína na forma solúvel. Essa característica de tratamento da proteína ligada à resina faz com que o processo de solubilização e recuperação da proteína recombinante seja mais simples e direcionado, evitando protocolos extras nos quais pode haver perda da proteína recombinante (Zhu *et al.*, 2005; Li & Huang, 2007). A purificação da TsQ3 por meio de resina de níquel apresentou um bom rendimento e adequado nível de pureza. Foram observadas duas bandas de alta massa molecular, com aproximadamente 45 e 70 kDa (Figura 13). Essas bandas aparecem no gel SDS-PAGE com menor intensidade de coloração do que a banda principal, de 22,7 kDa. As bandas de alta massa molecular podem representar a TsQ3 em forma de dímero e trímero, uma vez que apresentam massas correspondentes a duas e três vezes a massa monomérica da TsQ3, 22,7 kDa. As bandas de alta massa também foram reconhecidas pelo soro  $\alpha$ -TsP de *T. serrulatus* no ensaio de Western Blot, corroborando a hipótese de formação de dímero e trímero de TsQ3. Legros *et al.* (2001) observaram um dímero da proteína quimérica AaH1+AaH2 quando analisada por Western Blot.

A fim de verificar a reatividade da TsQ3 e da TsP frente aos soros produzidos nesse trabalho foi realizado um teste de ELISA. Ambos os antígenos foram bem reconhecidos por todos os soros produzidos nesse ensaio (Figura 14). Esse alto reconhecimento do soro  $\alpha$ -TsP contra a TsQ3 mostra que a proteína quimérica possui semelhança de epítomos com componentes antigênicos da peçonha. No trabalho de Guatimosim *et al.* (2000) foi encontrado alto reconhecimento do soro anti-TsNTxP recombinante contra peçonha bruta, fração tóxica G50 e a TsNTxP nativa, além de boa capacidade de neutralização dos efeitos tóxicos da peçonha bruta. Já Mendes *et al.* (2008) não observaram reconhecimento expressivo por ELISA dos soros produzidos contra formas recombinantes da toxina Ts1, anti-Ts1<sub>(1)</sub> e anti-Ts1<sub>(2)</sub>, frente a peçonha bruta. No entanto, Ts1<sub>(2)</sub> foi capaz de induzir a produção de soro neutralizante com similaridade ao trabalho de Guatimosim *et al.* (2000), ou seja, 2 DL<sub>50</sub>/100 $\mu$ L de soro. Esse resultado sugere que, mesmo com baixo reconhecimento por ELISA, o soro produzido pode ter capacidade neutralizante elevada.

Para efeito comparativo e avaliação da evolução na produção de anticorpos contra os antígenos utilizados (TsQ3 ou TsP), foram coletados soros 15 dias após a inoculação de cada

dose. Os soros coletados foram testados por ELISA para a avaliação do grau de reconhecimento contra os antígenos utilizados na imunização. Além disso, a titulação dos soros imunes foi realizada com o soro coletado após o último reforço (Figura 15). Desde a primeira dose, os soros coletados referentes aos quatro grupos de imunização foram testados contra ambos os antígenos. Os soros apresentaram aumento na capacidade de reconhecimento ao próprio antígeno e também ao antígeno cruzado. Após a quarta dose a maior parte dos soros manteve o título estável, com valores próximos aos encontrados no soro final. No entanto o soro  $\alpha$ -TsQ3 necessitou de mais doses para aumentar o seu valor de reconhecimento contra a TsP. Nesse caso, foi verificado que o soro de uma coelha reconheceu muito bem a TsP e o soro da outra coelha (ambas imunizadas apenas com TsQ3) não foi capaz de produzir um soro com capacidade de reconhecimento equiparável (dados não apresentados). Esse fato nos mostra como a produção de anticorpos pode ser variável de indivíduo para indivíduo. Maria *et al.*, (2005) encontrou variação semelhante ao analisar soros de cavalos produtores da FUNED, cada animal produzia um soro com capacidade neutralizante e reconhecimento de epítomos diferente entre si. Esse fato ilustra bem a necessidade do uso de um grupo amostral maior para experimentos de produção de soro (Mendes *et al.*, 2004).

O soro-neutralização com os soros produzidos apresentou resultados menores do que o esperado. O soro  $\alpha$ -TsQ3 e os outros soros que utilizaram essa proteína como imunógeno apresentaram capacidade de neutralização menor do que o soro  $\alpha$ -TsP. Esse fato pode estar relacionado com a produção de anticorpos contra a  $\alpha$ -TsQ3 ter sido mais intensa contra epítomos que se localizam distantes do sítio ativo dessas toxinas. Duarte *et al.*, (2010) sintetizaram membradas de SPOT com a sequência de aminoácidos da anatoxina TsNTxP de maneira descontínua. Camundongos imunizados com um peptídeo contendo as porções N- e C-terminais dessa toxina, apresentaram resistência contra o desafio vacinal com a peçonha bruta. Esse peptídeo foi mapeado na estrutura 3D da toxina, com ambas as extremidades próximas na superfície da TsNTxP. Portanto a menor capacidade protetora observada no soro  $\alpha$ -TsQ3 pode ser devido a ausência de epítomos descontínuos em sua estrutura terciária ou devido a produção principal de anticorpos contra epítomos distantes dos sítios ativos dessas toxinas. Assim, novos estudos serão importantes para a determinação dos epítomos mais importantes para a neutralização da peçonha de *T. serrulatus*.

Os trabalhos de transcriptoma de glândulas de peçonha de escorpiões vêm revelando novas moléculas como neurotoxinas, proteases, lipases, hialuronidases entre outras moléculas (Alvarenga *et al.*, 2012; Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Valdez-Velázquez *et al.*, 2013; Mille *et*

*al.*, 2014). Neste trabalho, além das toxinas já conhecidas, foram descritas novas sequências de proteases presentes na peçonha de *T. serrulatus*. O conhecimento dessas novas proteínas é de suma importância para o melhor entendimento da peçonha e também de seus efeitos durante o envenenamento. Assim podem ser analisados de maneira mais clara, sintomas mais incomuns ou brandos apresentados por vítimas de acidentes escorpiônicos.

Essas enzimas possuem grande importância nas peçonhas de serpentes e de algumas aranhas, no entanto sua função e contribuição nas peçonhas de escorpiões ainda são pouco conhecidas. Por isso a descoberta de novas sequências e o entendimento do papel das proteases no envenenamento escorpiônico é de grande importância (Horta et al., 2014). Nesse trabalho foram descritas sequências de proteases potencialmente encontradas na peçonha de *T. serrulatus*. A maior parte dessas sequências está designada a classe das metaloproteases e uma pertencente à classe das serino proteases. O grupo das metaloproteases é uma importante classe de proteases, que necessitam da presença de um íon metálico para desenvolver sua correta função. As metaloproteases dependentes de zinco são um grupo bem diversificado e podem apresentar diferentes sítios ativos (Hooper, 1994). A classe das serino proteases possui várias enzimas bem caracterizadas e utilizadas em laboratórios. Essas proteases são a segunda classe mais encontrada nas peçonhas de serpentes e geralmente afetam os sistemas de homeostase, como pressão e coagulação sanguínea (Serrano, 2013).

As sequências das TsMS 1-10 foram obtidas através da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus* construída por Kalapothakis *et al.* (2001). O mRNA foi obtido dois dias após a extração de peçonha dos escorpiões, o que pode favorecer o encontro de mais moléculas de mRNA's referentes a proteínas presentes na peçonha. Outros trabalhos que realizaram transcriptomas de glândulas de peçonha de escorpiões procederam a extração de mRNA após 2-5 dias da extração de peçonha (Alvarenga *et al.*, 2012; Rendón-Anaya *et al.*, 2012; Valdez-Velázquez *et al.*, 2013). Rendón-Anaya *et al.*, (2012) montaram três bibliotecas de cDNA do escorpião *C. noxius Hoffmann*, da glândula de peçonha em repouso, após cinco dias a extração de peçonha e do corpo do escorpião. Os autores encontraram aumento dos níveis de expressão de toxinas na biblioteca construída após a extração de peçonha. Em relação à primeira biblioteca construída por Kalapothakis *et al.*, (2001) e posteriormente analisada por Alvarenga *et al.*, (2012) foram sequenciados 1.629 clones. Destes 2% foram identificados como sequências de proteases, as TsMS's 1-10 (Carmo *et al.*, 2014). Foram obtidos um número maior de contigs com sequências de proteases com a segunda biblioteca (sequenciada por NGS) de cDNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus* (ao todo 34

proteases), porém ainda não foi realizado experimentos para a quantificação de expressão destes, bem como a análise da abundância relativa nas bibliotecas sequenciadas no MiSeq.

A estrutura primária das metaloproteases TsMS 1-11 apresentou a presença de peptídeo sinal e um propeptídeo. Essa estrutura típica pode ainda ser encontrada em outras neurotoxinas expressas nessa glândula de peçonha (Kalapothakis *et al.*, 2001). A presença do propeptídeo pode servir como um inibidor da atividade proteolítica até que as proteases possam desempenhar sua função (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990; Becker *et al.*, 1995; Anders *et al.*, 2001; Loechel *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2002). Fletcher *et al.* (2010) purificaram e descreveram a protease Antarease da peçonha de *T. serrulatus*. Essa protease apresentou massa molecular de 25 kDa, a massa desta toxina apresenta similaridade com as massas das TsMS's 1-9 maduras (cerca de 26 kDa). No entanto, a massa molecular das TsMS's 1-9 imaturas (com peptídeo sinal e propeptídeo) é de cerca de 45 kDa. Já é conhecido que, em serpentes, o processamento do propeptídeo ocorre no lúmen da glândula de peçonha, o que pode evitar que outros componentes da peçonha sejam degradados antes de serem inoculados. Esse processo se faz bastante interessante, uma vez que essas enzimas podem ter atividade na matriz extracelular do próprio escorpião antes de serem inoculadas junto à peçonha (Hite *et al.*, 1992; Grams *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 1996; Siigur *et al.*, 1996).

As proteases TsMS 1-9 foram identificadas como pertencentes a família ADAM, que pertence a classe Metzincin de metaloproteases. As enzimas dessa classe são comumente relacionadas ao processo de envenenamento, degradação de tecidos e distúrbios de coagulação sanguínea em acidentes com serpentes (Seals & Courtneidge, 2003). Esses sintomas não são comumente observados em picadas de escorpiões, com exceção de *Hadrroides lunatus* (Costal-Oliveira *et al.*, 2012). Nos acidentes com *T. serrulatus* os sintomas de degradação de matriz extracelular e distúrbios de coagulação sanguínea não são observados. Este fato pode ser devido à baixa quantidade de proteases presentes na peçonha e/ou a baixa atividade dessas proteases na peçonha. Em relação ao sítio ativo das TsMS's 1-9, há um resíduo de glicina conservado em quase todas as sequências, no entanto a TsMS 3 possui um resíduo de alanina nessa posição, apesar desta mutação a presença desse aminoácido não deve alterar consideravelmente sua atividade devido ao tamanho reduzido do radical da alanina.

A TsMS 10 pertence a família Gluzincin que possui representantes relacionados a diversos processos biológicos como a conversão de angiotensina I em II (Hooper, 1994). Essa família de proteases possui membros como termolisina, neprilisina, endopeptidase-24.11,

enzima convertora de angiotensina e outras metaloproteases aminopeptidases que podem ser encontrados em vários grupos, como procariotos e eucariotos (Hooper, 1994). Dentro dessa família, a TsMS 10 se assemelha mais a endopeptidase-24.11 em sequência primária e padrão do sítio ativo. Essa subfamília possui atividade de N-endopeptidase e preferência por clivagem de aminoácidos hidrofóbicos (Le Moual *et al.*, 1991; Bland *et al.*, 2008). A preferência de clivagem por aminoácidos hidrofóbicos e presentes na porção N-terminal, sugere que essa enzima possa ser relacionada ao processamento pós traducional de proteínas da peçonha, como na clivagem de peptídeo sinal.

Com a técnica de sequenciamento de nova geração, a montagem de transcriptomas com RNA-Seq fica mais completa e sensível, podendo ser identificados transcritos raros que não seriam encontrados em bibliotecas clássicas de cDNA. Dessa maneira, foi a primeira vez que uma protease com domínio de desintegrina foi identificada na peçonha de um escorpião. A TsMS 11 se enquadra dentro da subfamília ADAM-17 de metaloproteases com domínio desintegrina e domínio proximal de ligação a membrana. Essas enzimas estão relacionadas com o processamento e liberação do fator TNF- $\alpha$  (fator  $\alpha$  de necrose tumorol), porém a expressão dessa enzima na glândula de peçonha de *T. serrulatus* pode ser relacionada à outra função (Black *et al.*, 1997; Cerretti, 1999). Apesar da presença do domínio de peptídeo sinal essa enzima pode estar ancorada as células da glândula de peçonha, ou ser liberada junto à peçonha. A presença dessa enzima na peçonha pode potencializar distúrbios na homeostase e de liberação de TNF- $\alpha$  nos tecidos afetados por TsP após um acidente escorpiônico.

A TsSP 1, única serino protease potencialmente presente na TsP, pertence a família das tripsinas-like. Essas enzimas estão envolvidas na clivagem de proteínas próxima a resíduos básicos K ou R (Rypniewski *et al.*, 1994; Perona & Craik, 1995; Perona & Craik, 1997). As peçonhas de serpentes já possuem serino proteases melhor caracterizadas que afetam diretamente a agregação de plaquetas, coagulação e pressão sanguínea e degradação de fibrina (Serrano, 2013). A TsSP 1 foi encontrada incompleta nas bibliotecas de cDNA (falta parte da porção N-terminal incluindo todo peptídeo sinal), sendo necessário mais um passo de sequenciamento para obter essa sequência completa. Essa enzima apresentou sítio catalítico completo na porção C-terminal e uma sequência de cerca de 100 aminoácidos na porção N-terminal que não apresentou similaridade com outros domínios. Essas proteases costumam ser expressas de forma inativa, necessitando processamento para se tornarem ativas. Dessa forma, a porção N-Terminal pode ser relacionada ao propeptídeo da TsSP 1 (Perona & Craik, 1995).

A detecção da atividade proteolítica foi realizada com ensaio de clivagem do fibrinogênio. Essa atividade só foi detectada com o uso de 3 µg de peçonha, quantidade alta quando comparada ao valor de DL<sub>50</sub> da peçonha desse escorpião, 22 µg para camundongos Blab/c de 20 g. Bello et al., (2006) caracterizaram a atividade proteolítica da peçonha da serpente *Bothrops leucurus* utilizando o mesmo ensaio que este trabalho. Proporcionalmente a TsP eles utilizaram 31 vezes menos peçonha considerando a proporção peçonha/substrato (massa/massa).

O ensaio de clivagem do fibrinogênio mostrou que TsP é capaz de clivar as cadeias α e β dessa molécula (Figura 17). Inibidores específicos de proteases para as classes de metaloproteases, serino proteases, cisteíno proteases e aspártico proteases foram utilizados. No entanto, a atividade proteolítica foi parcialmente inibida apenas com EDTA (quelante de íons metálicos). Essa atividade residual verificada pode ser devida a incompleta inibição das metaloproteases ou a presença de outras classes de proteases na peçonha. Como foi apresentado, TsP possui uma serino protease que pode ter sido a responsável por essa atividade detectada. O fato de não ser observado inibição da atividade proteolítica por PMSF (inibidor específico de serino proteases) pode ser devido a maior presença de metaloproteases que degradaram o substrato enquanto TsSP 1 se manteve inativa. Brazón *et al.*, (2014) verificou atividade fibrinogenolítica da peçonha de *T. discrepans* sugerindo a presença de metaloproteases e serino proteases. Outros autores também sugerem a presença de serino proteases em peçonhas escorpiônicas (Gao *et al.*, 2008; Louati *et al.*, 2011). Outros autores já verificaram atividade proteolítica em TsP, utilizando outros substratos como gelatina por zimograma, VAMP-2 e VAMP-8 por clivagem peptídeos e por clivagem de peptídeos com fluorescência Abz-FLRRV-EDDnp (Almeida *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2010; Venâncio *et al.*, 2013) reforçando os dados obtidos nesse trabalho.

A TsP apresenta preferência de clivagem por sítios próximos a aminoácidos básicos K ou R (Figura 18). A presença de componentes da peçonha que sofrem processamento pós traducional sugere relação entre proteólise e maturação de toxinas. Muitas toxinas possuem K como primeiro aminoácido e GKK na extremidade C-terminal. Martin-Eauclaire *et al.*, (1994) descreveram os valores de DL<sub>50</sub> em camundongos (Swiss 20 g por via subcutânea) para as toxinas, nomeadas nesse trabalho, de TsIII, TsIV e TsV com diferentes resíduos no C-terminal (atualmente chamadas de Ts3 devido ao processamento pós traducional) de *T. serrulatus*. Enquanto o precursor dessas toxinas possui o C-terminal com a sequência GKCKSGKK, as toxinas derivadas desse precursor apresentam valores de DL<sub>50</sub> diferentes:

TsV, GKCKSGK (DL<sub>50</sub> 0,2 µg); TsIV, GKCKS (DL<sub>50</sub> 0,4 µg) e TsIII, GKC (DL<sub>50</sub> 2,5 µg). Sabendo que a sequência primária destas toxinas é a mesma, essas modificações mostram a grande importância do processamento proteolítico para a atividade das toxinas dessa peçonha.

Estudos de peptidômica em peçonhas de escorpiões vêm mostrando uma grande diversidade de peptídeos que são originados de proteínas maiores (Rates *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que poucos transcritos da glândula podem gerar uma grande variedade de peptídeos após modificações pós-tradicionais. A presença dessa grande variedade de peptídeos pode se dever ao processamento proteolítico das proteases encontradas na peçonha (Verano-Braga *et al.*, 2013). A grande diversidade de proteases encontradas na peçonha pode indicar diferentes alvos para cada protease.

O trabalho apresentado por Fletcher *et al.*, (2010) apresenta evidências de que a protease Antarease pode ser responsável pelo sintoma de pancreatite observado em alguns envenenamentos por *T. serrulatus*. Eles observaram que o sítio de clivagem reconhecido por essa enzima nas proteínas VAMP-2 e -8 são próximos aos resíduos KRK e RK respectivamente, reforçando os dados obtidos neste trabalho. Esse fato faz com que essas enzimas sejam analisadas mais profundamente para serem utilizadas como alvos na produção de soro antiescorpiônico. A descoberta de que essas enzimas podem gerar efeitos tóxicos em pessoas acidentadas com escorpiões, além dos efeitos causados pelas toxinas, faz com que o uso de proteases em formulações de antígenos pode gerar um soro antiescorpiônico mais eficaz (Cávez-Olórtegui *et al.*, 1997; Guatimosim *et al.*, 2000; Machado De Avila *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2010; Carmo *et al.*, 2014). Assim, esses resultados podem prover melhor entendimento para o desenvolvimento de um soro que proteja também contra componentes que estão fora do grupo de neurotoxinas.

## 7. Conclusão

- Apesar da diminuição da quantidade de proteínas obtida nas sucessivas extrações de peçonha, o mesmo não perde toxicidade.
- A proteína TsQ3 foi capaz de gerar anticorpos que reconhecem a TsP. Apesar do soro  $\alpha$ -TsQ3 não apresentar capacidade neutralizante elevada esse soro foi capaz de reconhecer muito bem a TsP.
- A imunização utilizando TsP e TsQ3 foi capaz de aumentar a capacidade de neutralização do soro em comparação com o soro produzido contra TsQ3. Com o uso de protocolos de imunização utilizando proteínas recombinantes e peçonha pode aumentar a capacidade protetora do soro produzido. No entanto, a inclusão de outras toxinas e epítomos devem aumentar a imunogenicidade da proteína quimérica para a obtenção de um soro neutralizante.
- Foi possível identificar uma grande diversidade de proteases na peçonha de *T. serrulatus* que não era esperado para essa espécie. E ainda existem mais de uma classe de proteases na peçonha de *T.serrulatus*.
- As proteases presentes na TsP possuem preferência por clivar aminoácidos básicos.
- Essas enzimas podem representar uma nova classe toxinas escorpiônicas e precisam ser estudadas como novos alvos na produção de soro antiescorpiônico.

## **7.1 Perspectivas**

Com os resultados apresentados nesta tese pretendemos dar continuidade ao projeto da seguinte forma:

- Identificar os epítomos mais reativos e imunogênicos que confirmam a produção de anticorpos neutralizantes contra a TsP.
- Construir outro cassete de expressão quimérico com essas sequências identificadas e novas toxinas.
- Imunizar e avaliar a imunogenicidade e o grau de proteção conferido pelo soro anti-quiméra.
- Caracterizar as demais sequências de proteases encontradas.
- Identificar novos componentes da peçonha nas bibliotecas de cDNA produzidas por RNA-Seq.
- Expressar de maneira recombinante as proteases identificadas e caracterizar sua ação bioquímica.
- Produzir soro contra as proteases recombinantes e nativas e caracterizar seu potencial protetor contra a peçonha bruta.

## 8. Referências Bibliográficas

- ABBADI, M.; IRUNBERRY, J. An attempt at detoxification of scorpion venom (*Androctonus australis*). *Arch. Inst. Pasteur Alger.* **1970**, 48:131-8.
- ABDEL-RAHMAN MA, QUINTERO-HERNANDEZ V, POSSANI LD. Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). *Toxicon.* **2013** Nov;74:193-207.
- ABDERRAZEK, R.B.; HMILA, I.; VINCKE, C.; BENLASFAR, Z.; PELLIS, M.; DABBEK, H.; SAERENS, D.; EL AYEB, M.; MUYLDERMANS, S.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B. Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. *Biochem. J.* **2009**. Nov 11;424(2):263-72.
- ABDERRAZEK, R.B.; VINCKE, C.; HMILA, I.; SAERENS, D.; ABIDI, N.; EL AYEB, M.; MUYLDERMANS, S.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahIII10 nanobody with improved neutralization of AahII scorpion toxin. *Protein Eng. Des. Sel.* **2011** Sep;24(9):727-35.
- ABIB, L.; LARABA-DJEBARI, F. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. *Can. J Physiol. Pharmacol.* **2003**. Dec;81(12):1118-24.
- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.
- AIT-AMARA, D.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; ROMI, R.; MERY, J.; BRUGIDOU, J.; ALBERICIO, F.; DEVAUX, C.; GRANIER, C. Antibodies cross-reactive with the scorpion-toxin II from *Androctonus australis Hector* elicited in mice by a synthetic peptide. *Nat. Toxins.* **1993**. 1(4):255-62.
- 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.* **2002**. Jul;40(7):1041-5.
- AL-SADOON, M.K.; JARRAR, B. M. Epidemiological study of scorpion stings in Saudi Arabia between 1993 and 1997. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop.* **2003**. Dis. 9, 54–64.
- ALVARENGA, É.R.; MENDES, T.M.; MAGALHÃES, B.F.; SIQUEIRA, F.F.; DANTAS, A.E.; BARROCA, T.M.; HORTA, C.C.; KALAPOTHAKIS, E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics*, **2012**. v. 2, p. 210-220,
- ALVARENGA, L.M.; DINIZ, C.R.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon.* **2002**. Jan;40(1):89-95.
- 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*. **2005**. Nov;46(6):664-71.
- AMARO, I.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. *ImmunolLett*. **2011**. Sep 30;139(1-2):73-9.
- ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J*. **2001**.15: 1837–1839.
- 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<sup>+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta*. **1994**. Jan 5;1199(1):69-75.
- ATTAMO, H.; DIAWARA, N.A.; GARBA, A. Epidemiology of scorpion envenomations in the pediatric service of the Agadez hospital center (Niger) in 1999. *Bull. Soc.Pathol.Exot*. **2002**. Aug;95(3):209-11.
- AUBREY, N.; MUZARD, J.; CHRISTOPHE PETER, J.; ROCHAT, H.; GOYFFON, M.; DEVAUX, C.; BILLIALD, P. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin AahI, and functional evaluation versus other antibody fragments. *Toxicon*. **2004**. Mar 1;43(3):233-41.
- BAHRAOUI, E.; PICHON, J.; MULLER, J.M.; DARBON, H.; EL AYEB, M.; GRANIER, C.; MARVALDI, J.; ROCHAT, H. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J Immunol*.**1988**. Jul 1;141(1):214-20.
- BAHRAOUI, E.M.; GRANIER, C.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H.; EL AYEB, M. Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *J Immunol*. **1986**. May 1;136(9):3371-7.
- BARHANIN, J., GIGLIO, J. R.; LEOPOLD, 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<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem*. **1982**. 257:12553–12558.
- BECCALONI, J. Arachnids. Natural History Museum, London. 2009. ISBN 978-0-656-09220-7.
- BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. **1997**. Jun;35(6):821-35.
- BECKER, J.W.; MARCY, A.I.; ROKOSZ, L.L.; AXEL, M.G.; BURBAUM, J.J.; FITZGERALD, P.M.; CAMERON, P.M.; ESSER, C.K.; HAGMANN, W.K.; HERMES, J.D. *et al*. Stromelysin-1: Three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci*. 4: **1995**.1966–1976.
- BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, L.H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Isolation and biochemical characterization of a

fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. **2006**. Feb;88(2):189-200.

BENKHADIR, K.; MEJRI, T.; BEL HAJ RHOUMA, R.; EL AYEB, M.; KAROUI, H. In vivo and in vitro protection against lethal activity of *Buthus occitanus tunetanus* venom with a recombinant protein. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*. **2002**. 79(1-4):19-26.

BERGERON, Z.L.; BINGHAM, J. P. Scorpion toxins specific for potassium (K<sup>+</sup>) channels: a historical overview of peptide bioengineering. *Toxins (Basel)*. **2012**. Nov 1;4(11):1082-119.

BERGMAN, N. J. Clinical description of *Parabuthus transvaalicus* scorpionism in Zimbabwe. *Toxicon*. **1997**. May;35(5):759-71.

BILLEN, B.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Curr. Pharm. Des*. **2008**. 14(24):2492-502.

BLACK RA, RAUCH CT, KOZLOSKY CJ, PESCHON JJ, SLACK JL, WOLFSON MF, CASTNER BJ, STOCKING KL, REDDY P, SRINIVASAN S, NELSON N, BOIANI N, SCHOOLEY KA, GERHART M, DAVIS R, FITZNER JN, JOHNSON RS, PAXTON RJ, MARCH CJ, CERRETTI DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. **1997**. Feb 20;385(6618):729-33.

BLAND, N.D.; PINNEY, J.W.; THOMAS, J.E.; TURNER, A.J.; ISAAC, R.E. Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. *BMC Evol. Biol*. **2008**. Jan 23;8:16.

BODE W.; F.X. GOMIS-RUTH, W. Stocker, Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins', *FEBS Lett*. 331. **1993**. 134-140.

BORCHANI, L.; SASSI, A.; BEN GHARSA, H.; SAFRA, I.; SHAHBAZZADEH, D.; BEN LASFAR, Z.; EL AYEB, M. The pathological effects of Heminecrolysin, a dermonecrotic toxin from *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom are mediated through its lysophospholipase D activity. *Toxicon*. **2013**. Apr 2;68C:30-39.

BORCHANI, L.; SASSI, A.; SHAHBAZZADEH, D.; STRUB, J.M.; TOUNSI-GUETTETI, H.; BOUBAKER, M.S.; AKBARI, A.; VAN DORSSELAER, A.; EL AYEB, M. Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. *Toxicon*. **2011a**. Jul;58(1):130-9.

BORCHANI, L.; SASSI, A.; BEN YEKHLEF, R.; SAFRA, I.; EL AYEB, M. Heminecrolysin, a potential immunogen for monospecific antivenom production against *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon*. **2011b**. Dec 1;58(8):681-8.

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*. **2010**. Feb-Mar; 55(2-3):436-54.

BORTOLUZZI, LR; QUEROL, MVM, QUEROL, E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neo trop.* **2007**. vol.7, n.3, pp. 357-359.

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon.* **2007**. Feb;49(2):142-58.

BOUHAOUALA-ZAHAR B, BENKHALIFA R, SRAIRI N, ZENOUAKI I, LIGNY-LEMAIRE C, DREVET P, SAMPIERI F, PELHATE M, EL AYEB M, MÉNEZ A, KAROUI H, DUCANCEL F. A chimeric scorpion alpha-toxin displays de novo electrophysiological properties similar to those of alpha-like toxins. *Eur J Biochem.* **2002** Jun;269(12):2831-41.

BRAZÓN, J.; GUERRERO, B.; D'SUZE, G.; SEVCIK. C.; AROCHA-PIÑANGO, C.L. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **2014**. Feb;168:62-9.

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

CALDERON-ARANDA, E.S.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine.* **1995**. Sep;13(13):1198-206.

CALDERON-ARANDA, E.S.; SELISKO, B.; YORK, E.J.; GURROLA, G.B.; STEWART, J.M.; POSSANI, L.D. Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. *Eur. J Biochem.* **1999**. Sep;264(3):746-55.

CALVETE, J.J. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon.* **2013**. Feb;62:40-9.

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

CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D.; MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature.* **1982** Mar 4;296(5852):90-1.

CARDOSO, J.L.; FAN, W.H.R.; ARAUJO, A.A.; SANTALUCIA, M.; LOPES J.M. Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990–1993) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 28. **1995**. p. 10

CARMO AO, OLIVEIRA-MENDES BB, HORTA CC, MAGALHÃES BF, DANTAS AE, CHAVES LM, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS E. Molecular and functional characterization of metallo-serrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon.* **2014** Nov;90:45-55.

- CARMO, A. O. Expressão heteróloga e purificação da tityustoxina: obtenção da proteína recombinante Ts3 do escorpião *Tityus serrulatus*. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral. **2011**. 107 f., enc.: Dissertação.
- CARNEIRO, A. M.; KUSHMERICK, C.; KOENEN, J.; ARNDT, M. H.; CORDEIRO, M. N.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*. **2003**. Mar 1;41(3):305-13.
- CATTERALL, W.A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **1980**;20:15-43.
- CELIS, A.; GAXIOLA-ROBLES, R.; SEVILLA-GODÍNEZ, E.; OROZCO VALERIO MDE, J.; ARMAS, J. Trends in mortality from scorpion stings in Mexico, 1979-2003. *Rev.Panam.Salud.Publica*. **2007**. Jun;21(6):373-80. Spanish.
- CERRETTI DP. Characterization of the tumour necrosis factor alpha-converting enzyme, TACE/ADAM17. *Biochem Soc Trans*. **1999**. Feb;27(2):219-23.
- CESTÈLE, S. & CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. **2000**. 82(9-10), 883-892.
- CESTÈLE, 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*. **1998**. 21(4), 919-931.
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C. AMARA, D. A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C.; GRANIER, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*. **1991**. Dec;9(12):907-10.
- 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*. **1997**. Feb;35(2):213-21.
- CHEN, R. & CHUNG, S. H. Binding modes and functional surface of anti-mammalian scorpion  $\alpha$ -toxins to sodium channels. *Biochemistry*. **2012a**. Oct 2;51(39):7775-82.
- CHEN, R. & CHUNG, S. H. Conserved Functional Surface of Antimammalian Scorpion  $\beta$ -Toxins. *J Phys Chem B*. **2012b**. Apr 12.
- CHIPPAUX, J. P. & GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop*. **2008**. Aug;107(2):71-9.
- CHIPPAUX, J.P. & GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. **1998** Jun;36(6):823-46.
- CHIPPAUX, J.P.; DIOUF, A.; STOCK, R.P.; PARRA, H.J., MASSOUGBODJI, A. Report of the 4th International Conference on Envenomations by Snakebites and Scorpion Stings in Africa, Dakar, April 25-29, 2011. *Toxicon*. **2011**. Oct;58(5):426-9.

CHOWELL, G.; HYMAN, J.M.; DÍAZ-DUEÑAS, P.; HENGARTNER, N.W. Predicting scorpion sting incidence in an endemic region using climatological variables. *Int. J Environ Health Res.* **2005**. Dec;15(6):425-35.

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

CHUGUNOV, A.O.; KOROMYSLOVA, A.D.; BERKUT, A.A.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J.; POLYANSKY, A.A.; PENTKOVSKY, V.M.; VASSILEVSKI, A.A.; GRISHIN, E.V.; EFREMOV, R. G. Modular Organization of  $\alpha$ -Toxins from Scorpion Venom Mirrors Domain Structure of Their Targets - Sodium Channels. *J Biol. Chem.***2013**. May 1.

CLOT-FAYBESSE, O.; JUIN, M.; ROCHAT, H.; DEVAUX, C. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett.***1999**. Sep 24;458(3):313-8.

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.* **2012**. Apr;279(8):1495-504.

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  $\alpha$ -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon.* **2011**. Jul;58(1):54-61.

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.***2009**. 16(8):920-32.

CORONA, M.; ZURITA, M.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B. Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Toxicon.* **1996**. Feb;34(2):251-6.

COSTAL-OLIVEIRA, F.; DUARTE, C.G.; MACHADO DE AVILA, R.A.; MELO, M.M.; BORDON, K.C.; ARANTES, E.C.; PAREDES, N.C.; TINTAYA, B.; BONILLA, C.; BONILLA, R.E.; SUAREZ, W.S.; YARLEQUE, A.; FERNANDEZ, J.M.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon.***2012**. Oct;60(5):934-42.

CRANKSHAW, M. W.; GRANT, G. A. Modification of cysteine. *Curr Protoc Protein Sci.* **2001**. May;Chapter 15:Unit15.1.

CUI, Y.; GUO, G. L.; LIU, Y. F.; MAO, Y. Z.; ZHANG, R.; WU, C. F.; ZHANG, J. H. Construction of three different recombinant scorpion fusion proteins with bifunctional activity. *Indian J Biochem Biophys.* **2011**. Jun;48(3):141-7.

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

- DA SILVA, H.A.; PATHMESWARAN, A.; RANASINHA, C.D.; JAYAMANNE, S.; SAMARAKOON, S.B.; HITTHARAGE, A.; KALUPAHANA, R.; RATNATILAKA, G. A.; ULUWATTHAGE, W.; ARONSON, J.K.; ARMITAGE, J.M.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. Low-dose adrenaline, promethazine, and hydrocortisone in the prevention of acute adverse reactions to antivenom following snakebite: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med.* **2011**. May;8(5):e1000435.
- DAS GUPTA, S.C.; GOMES, A.; GOMES, A.; BASU, A.; LAHIRI, S.C. Comparative detoxification and protection of scorpion (*Heterometrus bengalensis*) venom by toxoid antiserum. *Indian J Exp. Biol.* **1989**. Jun;27(6):568-73.
- DE ROODT, A.R.; GARCÍA, S.I.; SALOMÓN, O.D.; SEGRE, L.; DOLAB, J.A.; FUNES, R.F.; DE TITTO, E.H. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon.* **2003**. Jun;41(8):971-7.
- DE SOUSA, L.; BONOLI, S.; QUIROGA, M.; PARRILLA, P. Scorpion sting epidemiology in Montes Municipality of the State of Sucre, Venezuela: geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **1996**. Mar-Apr;38(2):147-52.
- DEVAUX, C.; CLOT-FAYBESSE, O.; JUIN, M.; MABROUK, K.; SABATIER, J.M.; ROCHAT, H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Lett.* **1997**. Aug 4;412(3):456-60.
- DEVAUX, C.; CLOT-FAYBESSE, O.; PUGNIÈRE, M.; MANI, J.C.; ROCHAT, H.; GRANIER, C. A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high-affinity monoclonal antibodies and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *J Immunol Methods.* **2002**. Dec 20;271(1-2):37-46.
- DI TOMMASO, A.; JUSTE, M.O.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; DIMIER-POISSON, I.; BILLIALD, P.; AUBREY, N. Diabody mixture providing full protection against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis* venom. *J Biol. Chem.* **2012**. Apr 20;287(17):14149-56.
- DRAKOPOULOU, E.; ZINN-JUSTIN, S.; GUENNEUGUES, M.; GILQIN, B.; MÉNEZ, A.; VITA, C. Changing the structural context of a functional beta-hairpin. Synthesis and characterization of a chimera containing the curaremimetic loop of a snake toxin in the scorpion alpha/beta scaffold. *J Biol Chem.* **1996**. May 17;271(20):11979-87.
- DUARTE, C.G.; ALVARENGA, L.M.; DIAS-LOPES, C.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine.* **2010**. Feb 3;28(5):1168-76.
- DUCKERT, P.; BRUNAK, S.; BLOM, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel.* **2004** Jan;17(1):107-12.
- EL AYEB, M.; ROCHAT, H. Production of monoclonal antibodies. Scorpion antitoxins: characterization and molecular mechanisms of neutralization. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* **1988**. Jan-Apr;65(1-2):29-41.

ESIPOV, R. S.; STEPANENKO, V. N.; CHUPOVA, L. A.; MIROSHNIKOV, A. I. Production of recombinant oxytocin through sulfitolysis of inteincontaining fusion protein. *Protein Pept Lett.* **2012.** May;19(5):479-84.

ESPINO-SOLIS, G.P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J Proteomics.* **2009.** Mar 6;72(2):183-99.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **1998.** 8 (3): 175–185.

EZZINE, A.; M'HIRSI, E. L.; ADAB, S.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; HMILA, I.; BACIOU, L.; MARZOUKI, M.N. Efficient expression of the anti-AahI' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a Pichiapastoris system. *Biotechnol. Appl.Biochem.* **2012.** Jan-Feb;59(1):15-21.

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

FERNANDEZ, M.; LIU, X.; WOUTERS, M.A.; HEYBERGER, S.; HUSAIN, A. Angiotensin I-converting enzyme transition state stabilization by HIS1089: evidence for a catalytic mechanism distinct from other gluzincin metalloproteinases. *J Biol Chem.* **2001** Feb 16;276(7):4998-5004.

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

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

FONSECA, S.G.; FERREIRA, A.M.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with scorpion toxins detoxified by liposomal entrapment. *Braz. J Med. Biol. Res.* **1997.** Jul;30(7):883-6.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: *Natural Toxins* (C.L. Ownby, G.V. Odell, eds.), **1989.**S. 139, Pergamon Press, Oxford.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. *Front.Immunol.* **2013.** Jul 29;4:217.

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

GAO, R.; ZHANG, Y.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon*. **2008**. Aug 1;52(2):348-53.

GARCIA Y PEREZ, G.; MARTIN, M. F.; ROCHAT, H. Preparation of a polyvalent antivenom against various Mexican scorpion *Centruroides* species. *Toxicon*. **1988**. 26(11):1102-6.

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

GARCÍA-GÓMEZ, B.I.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.C.; PANIAGUA, J.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; POSSANI, L.D. Heterologous expression of a gene that codes for Pg8, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice. *Toxicon*. **2009**. Jun;53(7-8):770-8.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, *Humana Press*. **2005**.

GATTI-LAFRANCONI, P.; NATALELLO, A.; AMI, D.; DOGLIA, S. M.; LOTTI, M. Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. *FEBS J*. **2011**. Jul;278(14):2408-18.

GAZARIAN, K. G.; GAZARIAN, T.; HERN, R.; POSSANI, L. D. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*. **2005**. 23, 3357-3368.

GAZARIAN, T.; SELISKO, B.; HÉRION, P.; GAZARIAN, K. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Mol.Immunol.***2000** Aug-Sep;37(12-13):755-66.

GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, ADICONIS X,FAN L, RAYCHOWDHURY R, ZENG Q, CHEN Z, MAUCELI E, HACHOEN N, GNIRKE A, RHIND N,DI PALMA F, BIRREN BW, NUSBAUM C, LINDBLAD-TOH K, FRIEDMAN N, REGEV A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*. **2011** May 15;29(7):644-52.

GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L.F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett*. **1993**. 335, 76–80.

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

GUATIMOSIM, S.C.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon*. **2000**. Jan;38(1):113-21.

GUO, L. H.; ZHOU, M. Y.; SHEN, M. H.; WANG, E. B.; LIU, J. F.; YU, Y. J. Studies on genetic engineering of human insulin-purification and characterization of human proinsulin and insulin *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. **1992**. Jun;25(2):157-63.

GUREVITZ, M. Mapping of scorpion toxin receptor sites at voltage-gated sodium channels. *Toxicon*. **2012**. Sep 15;60(4):502-11.

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

HENEINE, I.F.; HENEINE, L. G. Stepwise iodination. A general procedure for detoxification of proteins suitable for vaccine development and antiserum production. *Biologicals*. **1998**. Mar;26(1):25-32.

HENEINE, L.G.; CARDOSO, V.N.; DANIEL, J.P.; HENEINE, I.F. Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives. *Toxicon*. **1986**. 24(5):501-5.

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

HÉRION, P.; GURROLA-BRIONES, G.; DEL ROCÍO SÁNCHEZ, M.; SAAVEDRA, R.; POSSANI, L. D. Monoclonal antibodies against noxiustoxin. *Hybridoma*. **1995**. Jun;14(3):247-51.

HERNÁNDEZ, R.; GAZARIAN, T.G.; HÉRION, P.S.; GAZARIAN, K.G. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. *ImmunolLett*.**2002**. Feb 1;80(2):97-103.

HERNÁNDEZ-SALGADO, K.; ESTRADA, G.; OLVERA, A.; CORONAS, F.I.; POSSANI, L.D.; CORZO, G. Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *ImmunolLett*.**2009**. Aug 15;125(2):93-9.

HITE, L.A.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin E from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrinlike structures. *Biochemistry*, **1992**. 31, 6203–6211.

HMILA, I.; ABDALLAH R, B.A.; SAERENS, D.; BENLASFAR, Z.; CONRATH, K.; AYEB, M.E.; MUYLDERMANS, S.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI'. *Mol.Immunol*. **2008**. Aug;45(14):3847-56.

HMILA, I.; COSYNS, B.; TOUNSI, H.; ROOSENS, B.; CAVELIERS, V.; ABDERRAZEK, R.B.; BOUBAKER, S.; MUYLDERMANS, S.; EL AYEB, M.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; LAHOUTTE, T. Pre-clinical studies of toxin-specific nanobodies: evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. *Toxicol. Appl.Pharmacol*. **2012**. Oct 15;264(2):222-31.

HMILA, I.; SAERENS, D.; BEN ABDERRAZEK, R.; VINCKE, C.; ABIDI, N.; BENLASFAR, Z.; GOVAERT, J.; EL AYEB, M.; BOUHAOUALA-ZAHAR, B.; MUYLDERMANS, S. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* **2010**. Sep;24(9):3479-89.

HOOPER, N.M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **1994**. 354: 1–6.

HORTA CC, MAGALHÃES BDE F, OLIVEIRA-MENDES BB, DO CARMO AO, DUARTE CG, FELICORI LF, MACHADO-DE-ÁVILA RA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS E. Immunological, and Biological Characterization of *Tityus serrulatus* Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. *PLoS Negl Trop Dis.* **2014** Feb 13;8(2):e2693.

INCEOGLU, B.; LANGO, J.; RABINOVICH, A.; WHETSTONE, P.; HAMMOCK, B.D. The neutralizing effect of a polyclonal antibody raised against the N-terminal eighteen-amino acid residues of birtoxin towards the whole venom of *Parabuthus transvaalicus*. *Toxicon.* **2006**. Feb;47(2):144-9. Epub 2005 Dec 13.

JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*, **1996**.34, 1269–1276.

JIA, L. Y.; XIE, H. F.; JI, Y. H. Characterization of four distinct monoclonal antibodies specific to BmK AS-1, a novel scorpion bioactive polypeptide. *Toxicon*. **2000**. May;38(5):605-17.

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

JUÁREZ-GONZÁLEZ, V.R.; RIAÑO-UMBARILA, L.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; ORTIZ-LEÓN, M.; ORTÍZ, E.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J Mol. Biol.* **2005**. Mar 11;346(5):1287-97.

JUSTE, M.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; DEVAUX, C.; BILLIALD, P.; AUBREY, N. Using a recombinant bispecific antibody to block Na<sup>+</sup> -channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**. Jan;64(2):206-18.

KAABI, H.; KHARRAT, R.; EL AYEB, M. Study of the protective capacity of scorpion venom *Buthus occitanus tunetanus* polymerised to glutaraldehyde in mice strains with different haplotypes. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* **2001**. 78(1-4):17-23.

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

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

- KALAPOTHAKIS E., JARDIM S., MAGALHAES A. C., MENDES T. M., DE MARCO L., AFONSO L. C., CHAVEZ-OLORTEGUI C. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*. **2001**. 39:679–685.
- KALAPOTHAKIS, E. & CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon*. **1997**. Oct;35(10):1523-9.
- KANG, T.; ZHAO, Y.G.; PEI, D.; SUCIC, J.F.; SANG, Q.X. Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. *J. Biol. Chem*. **2002**. 277: 25583–25591.
- KHARRAT, R.; ZENOUAKI, I.; BEN LASFAR, Z.; MILED, K.; EL AYEB, M. Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. *Toxicon*. **1997**. Jun;35(6):915-30.
- KHATTABI, A.; SOULAYMANI-BENCHEIKH, R.; ACHOUR, S.; SALMI, L.R.; SCORPION CONSENSUS EXPERT GROUP. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2011**. Jul;105(7):364-9.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **1975**. 256:495–7.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**. v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5.
- LEGROS, C.; CÉARD, B.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett*. **1998**. Jul 24;431(3):375-80.
- LEGROS, C.; KAABI, H.; EL AYEB, M.; CÉARD, B.; VACHER, H.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine*. **2001**. Dec 12;20(5-6):934-42.
- LEGROS, C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; PONGS, O.; BOUGIS, P. E. Toxin binding to chimeric K<sup>+</sup> channels immobilised on a solid nitrocellulose support. *Biochem Biophys Res Commun*. **2007**. Feb 23;353(4):1086-90.
- LE MOUAL, H.; DEVAULT, A.; ROQUES, B.P.; CRINE, P.; BOILEAU, G. Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J Biol Chem*. **1991** Aug 25;266(24):15670-4.
- LOECHEL, F.; GILPIN, B.J.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. Human ADAM 12 (meltrin-alpha) is an active metalloprotease. *J. Biol. Chem*. **1998**. 273: 16993–16997.
- LI, M. & HUANG, D. On-column refolding purification and characterization of recombinant human interferon-lambda1 produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. **2007**. May;53(1):119-23.

- LICEA, A.F.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Toxicon*. **1996**. Aug;34(8):843-7.
- LILA, B.A.; LARABA-DJEBARI, F. Enhanced immune sera and vaccine: safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine*. **2011**. Nov 8;29(48):8951-9.
- LO VECCHIO, F.; WELCH, S.; KLEMENS, J.; CURRY, S.C.; THOMAS, R. Incidence of immediate and delayed hypersensitivity to *Centruroides* antivenom. *Ann. Emerg. Med.* **1999**. Nov;34(5):615-9.
- LOBATO, F. C.; LIMA, C. G.; ASSIS, R. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R. O.; SALVARANI, F. M.; CARMO, A. O.; CONTIGLI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*. **2010**. Aug 31;28(38):6125-7.
- LOURENÇO, W. R. & CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae). *The Journal of Arachnology*. **1999**. 27: 154-158,
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., AND RANDALL, R. J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*. **1951**. 193: 265-275.
- LOUATI, H.; ZOUARI, N.; MILED, N.; GARGOURI, Y. A new chymotrypsin-like serine protease involved in dietary protein digestion in a primitive animal, *Scorpio maurus*: purification and biochemical characterization. *Lipids Health Dis*. **2011**. Jul 21;10:121.
- LUCAS, S.O Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan e os aracnídeos peçonhentos. *Hist. cienc. Saúde-Manguinhos*. **2003**, vol.10, n.3 pp. 1025-1035.
- MACHADO DE AVILA, R.A.; ALVARENGA, L.M.; TAVARES, C. A.; MOLINA, F., GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI. C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*. **2004**. Sep 1;44(3):233-41.
- MAHABA, H.M.A. Scorpion sting syndrome: epidemiology, clinical presentation and management of 2240 cases. *East.Mediterr. Health J*.**1997**.3, 82–89.
- MAKINO, T.; SKRETAS, G.; GEORGIU, G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microb Cell Fact*. **2011**. May 14;10:32.
- MANSOUR, N. Delay and characteristics of scorpion bite management in the Sidi-Bouزيد region. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*. **2001**. 78(1-4):25-31.
- MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DE LIMA, M. E.; 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. *Nat Toxins*. **1992**. 1(2):119-25.
- MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON JB, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, DEWEESE-SCOTT C, FONG JH, GEER LY, GEER RC, GONZALES NR, GWADZ M,

HURWITZ DI, JACKSON JD, KE Z, LANCZYCKI CJ, LU F, MARCHLER GH, MULLOKANDOV M, OMELCHENKO MV, ROBERTSON CL, SONG JS, THANKI N, YAMASHITA RA, ZHANG D, ZHANG N, ZHENG C, BRYANT SH. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2011** Jan;39.

MARCOS, E.; GIL, L.; LAZO, L.; IZQUIERDO, A.; BROWN, E.; SUZARTE, E.; VALDÉS, I.; GARCÍA, A.; MÉNDEZ, L.; GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G.; HERMIDA, L. Purified and highly aggregated chimeric protein DIIC-2 induces a functional immune response in mice against dengue 2 virus. *Arch Virol.* **2013.** Jan;158(1):225-30,

MARIA, W.S.; VELARDE, D.T.; ALVARENGA, L.M.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon.* **2005.** Aug;46(2):210-7.

MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; ALAMI, M.; GIAMARCHI, A.; MISSIMILLI, V.; ROSSO, J.P.; BOUGIS, P.E. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine.* **2006.** Mar 15;24(12):1990-6.

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

MAURANO, H.R. Do escorpionismo. Tese de doutoramento, Rio de Janeiro. *Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.* **1915.** pp. 1- 267.

MEBS, D. Venomous and poisonous animals. Medpharm Scientific publishers, Stuttgart, CRC Press. 2002

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

MENDES, BÁRBARA BRUNA RIBEIRO DE OLIVEIRA; KALAPOTHAKIS, EVANGUEDES. Estudo da toxina Ts1 nativa e recombinante de *Tityus serrulatus* na produção de soro neutralizante. - *UFMG, Instituto de Ciências Biológicas.* **2012.** 176 f. Dissertação (mestrado)

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

MENDES TM, OLIVEIRA D, FIGUEIREDO LF, MACHADO-DE-AVILA RA, DUARTE CG, DIAS-LOPES C, GUIMARÃES G, FELICORI L, MINOZZO JC, CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine.* **2013.** Jun 7;31(25):2749-55.

- MILLE BG, PEIGNEUR S, DIEGO-GARCÍA E, PREDEL R, TYTGAT J. Partialtranscriptomic profiling of toxins from the venom gland of the scorpion *Parabuthus stridulus*. *Toxicon*. **2014** Jun;83:75-83.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Escorpionismo. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Escorpionismo, p.39-47. **2001**.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de controle de escorpiões. – Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, **2009**.
- MOUHAT, S.; JOUIROU, B.; MOSBAH, A.; DE WAARD, M.; SABATIER, J.M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* **2004**. Mar 15;378(Pt 3):717-26
- MOUSLI, M.; DEVAUX, C.; ROCHAT, H.; GOYFFON, M.; BILLIALD, P. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Lett*. **1999**. Jan 15;442(2-3):183-8.
- NISANI, Z.; BOSKOVIC, D. S.; DUNBAR, S. G.; KELLN, W.; HAYES, W. K. Investigating the chemical profile of regenerated scorpion (*Parabuthus transvaalicus*) venom in relation to metabolic cost and toxicity. *Toxicon*. **2012**. Sep 1;60(3):315-23.
- NISANI, Z.; DUNBAR, S. G.; HAYES, W. K. Cost of venom regeneration in *Parabuthus transvaalicus* (Arachnida: Buthidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2007**. Jun;147(2):509-13.
- NJAH, M.; BEN ABDELAZIZ, A.; ABDOULI, M.; ZAHER, M.; GARAOU, A. Health program and use of community health workers: the example of scorpion envenomation in Tunisia. *Sante*. **2001**. Jan-Feb;11(1):57-62.
- NORTON, R.S.;McDONOUGH, S.I. Peptides targeting voltage-gated calcium channels. *Curr. Pharm. Des.* **2008**. 14(24):2480-91.
- PEDRAZA ESCALONA, M.; POSSANI, L. D.Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects.*Front.Biosci.*(Landmark Ed). **2013**. Jan 1;18:572-87.
- PERONA JJ, & CRAIK CS. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J Biol Chem*. **1997**. Nov 28;272(48):29987-90.
- PERONA JJ, & CRAIK CS. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci*. **1995**. Mar;4(3):337-60.
- 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*. **2001**. Oct;39(10):1495-504.
- PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. **2011** Sep 29;8(10):785-6.

- PIMENTEL, C.; M'BAREK, S.; VISAN, V.; GRISSMER, S.; SAMPIERI, F.; SABATIER, J. M.; DARBON, H.; FAJLOUN, Z. Chemical synthesis and 1H-NMR 3D structure determination of AgTs1-MTX chimera, a new potential blocker for Kv1.2 channel, derived from MTX and AgTs1 scorpion toxins. *Protein Sci.* **2008**. Jan;17(1):107-18.
- POSSANI, L. D.; FLETCHER JR., P.L.; FLETCHER, M.; RODE, G.S.; MOCHCA-MORALES, J.; LUCA, S.; CORONAS, F. V.; ALAGON, A.C. & MARTIN, B. M. Structural and functional characteristics of toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Mem. Inst. Butantan.* **1992**. 54, (2) 35-52,
- POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; SVENDSEN, I. The primary structure of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Carlsberg Res Commun.* **1982**. v.47, p.285- 289.
- POSSANI, L.D.; FERNÁNDEZ DE CASTRO, J.; JULIÁ, J.Z. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius Hoffmann*) venom. *Toxicon.* **1981**.19(2):323-9.
- PRENDINI, L.; WHEELER, W. C., Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics.* **2005**.21, 446–494.
- PUCCA, M.B.; ZOCCAL, K.F.; RONCOLATO, E.C.; BERTOLINI, T.B.; CAMPOS, L.B.; COLOGNA, C.T.; FACCIOLI, L.H.; ARANTES, E.C.; BARBOSA, J.E. Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. *J Immunotoxicol.* **2012** Apr-Jun;9(2):173-83.
- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; DEL POZO-YAUNER, L.; PEDRAZA-ESCALONA, M.; JUÁREZ-GONZÁLEZ, V. R.; ALCÁNTARA-RECILLAS, I.; POSSANI, L. D.; BECERRIL, B. Evaluation of three different formats of a neutralizing single chain human antibody against toxin Cn2: neutralization capacity versus thermodynamic stability. *Immunol.Lett.* **2012**. Apr 30;143(2):152-60
- RATES, B.; FERRAZ, K.K.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. *Toxicon.* **2008** Oct;52(5):611-8.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **1995**; 248:183-228.
- RENDÓN-ANAYA M, DELAYE L, POSSANI LD, HERRERA-ESTRELLA A. Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. *PLoS One.* **2012**. 7(8):e43331.
- REZENDE, N.A.; DIAS, M.B.; CAMPOLINA, D.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C.R.; AMARAL, C.F. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med.Hyg.***1995**. Mar;52(3):277-80.
- RIAÑO-UMBARILA, L.; CONTRERAS-FERRAT, G.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; MORELOS-JUÁREZ, C.; CORZO, G.; POSSANI, L.D.; BECERRIL, B. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J Biol. Chem.* **2011**. Feb 25;286(8):6143-51.

- RIAÑO-UMBARILA, L.; JUÁREZ-GONZÁLEZ, V.R.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; ORTÍZ-LEÓN, M.; POSSANI, L.D.; BECERRIL, B. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* **2005**. May;272(10):2591-601.
- ROCHA-E-SILVA, T. A.; SUTTI, R.; HYSLOP, S. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon.* **2009**. Jan;53(1):153-61.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C.; POSSANI, L.D. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon.* **2005**. Dec 15;46(8):831-44.
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C.; SCHWARTZ, E.F.; POSSANI, L.D. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon.* **2010**. Dec 15;56(7):1155-61.
- RODRÍGUEZ DE LA VEJA, R. C. & POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon.* **2005**. Dec 15;46(8):831-44.
- RYPNIEWSKI WR, PERRAKIS A, VORGAS CE, WILSON KS. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Eng.* **1994**. Jan;7(1):57-64.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHART, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. e ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science.* **1988**. v.239, p.487-491.
- SAMBROOK, J; FRITSH, E.F; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. *Cold Spring Harbor*, **1989**. 3 Volumes.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of the Science.* **1977**. v.74, n.12, p.5463-5467,
- SCHENONE, H.; FONTECILLA, J. Scorpion stings outbreaks in recently constructed urban dwellings inhabitants. *Bol.Chil.Parasitol.* **1998**. Jan-Jun;53(1-2):35-7.
- SCHMIEDER R & EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* **2011**. Mar 15;27(6):863-4.
- SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **2003** Jan 1;17(1):7-30. Review.
- SELISKO, B.; COSÍO, G.; GARCÍA, C.; BECERRIL, B.; POSSANI, D.; HORJALES, E. Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmanni*. *Toxicon.* **2004**. Jan;43(1):43-51.
- SERRANO SM. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon.* **2013**. Feb;62:19-26.

SHAH K, TOM BLAKE J, HUANG C, FISCHER P, KOO GC. Immunosuppressive effects of a Kv1.3 inhibitor. *Cell Immunol.* **2003** Feb;221(2):100-6.

SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; TU, A.T.; SIIGUR, J. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of fibrinolytic enzyme (lebetase) from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996.** 224, 229–236.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Disponível para consultas no seguinte endereço de internet: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>. Acessado em: 15/04/2013.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* **1985.** 228:1315–7.

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

SRAIRI-ABID, N.; KAABI, H.; MLAYAH-BELLALOUNA, S.; MEJRI, T.; SAMPIERI, F.; EL AYEB, M. Immunological characterization of a non-toxic peptide conferring protection against the toxic fraction (AahG50) of the *Androctonus australis hector* venom. *Toxicon.* **2008.** Mar 1;51(3):353-62.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* **2011.**

THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* **2003.** pr;41(5):541-57.

THOMAS, D.A.; FRANCIS, P.; SMITH, C.; RATCLIFFE, S.; EDE, N.J. *et al.* A broad-spectrum fluorescence-based peptide library for the rapid identification of protease substrates. *Proteomics.* **2006.** 6: 2112–2120.

TODD, C. An Anti-serum for Scorpion Venom. *J Hyg (Lond).* **1909.** Apr;9(1):69-85.

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.* **2002.** vol.36, n.5, pp. 631-633.

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

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

- VALDEZ-VELÁZQUEZ LL, QUINTERO-HERNÁNDEZ V, ROMERO-GUTIÉRREZ MT, CORONAS FI, POSSANI LD. Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLoS One*. **2013** Jun 20;8(6):e66486.
- VALDIVIA, H. H. & POSSANI, L. D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *TCM*. **1998**. v.8, n.3, p.111-118.
- VAN WART, H.E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **1990**. 87: 5578–5582.
- VARGA Z, GURROLA-BRIONES G, PAPP F, RODRÍGUEZ DE LA VEGA RC, PEDRAZA-ALVA G, TAJHYA RB, GASPAR R, CARDENAS L, ROSENSTEIN Y, BEETON C, POSSANI LD, PANYI G. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol Pharmacol*. **2012**. Sep;82(3):372-82.
- VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V. L.; BENDHACK, L. M.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. ARANTES, E. C. Effects of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **2005**. May;141(1):85-92.
- VENÂNCIO, E.J.; PORTARO, F.C.; KUNIYOSHI, A.K.; CARVALHO, D.C.; PIDDE-QUEIROZ, G.; TAMBOURGI, D.V. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon*. **2013**. Mar 15. pii: S0041-0101.
- VERANO-BRAGA, T.; DUTRA, A.A.; LEÓN, I.R.; MELO-BRAGA, M.N.; ROEPSTORFF, P.; PIMENTA, A.M.; KJELDSEN, F. Moving pieces in a venom puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. *J Proteome Res*. **2013** Jul 5;12(7):3460-70.
- VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M. N.; LAUTNER, R. Q.; GOMES, E. R.; MATA-MACHADO, L. T.; MURARI, A.; ROCHA-RESENDE, C.; ELENA DE LIMA, M.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A.; PIMENTA, A. M. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. *Toxicon*. **2010**. Dec 15;56(7):1162-71. Epub., Apr. 22.
- VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; Silva, D. M. R.; IANZER, D.; Martin-Eauclaire, M.F; Bougis, P.E; de Lima, M.E.; Santos, R.A.S.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2008**. v. 371, p. 515-520,
- VILELA, E. Soroterapia anti-escorpiônica. *Brazil-médico*. **1917**. 31,393.
- WANG, H.; SUN, X.; ZHANG, Y.; LI, S.; CHEN, K.; SHI, L.; NIE, W.; KUMAR, R.; TZIPORI, S.; WANG, J.; SAVIDGE, T.; FENG, H. A chimeric toxin vaccine protects against primary and recurrent *Clostridium difficile* infection. *Infect Immun*. **2012**. Aug; 80(8):2678-88. Epub May 21.

WATSON, D.S.; JAMBUNATHAN, K.; ASKEW, D.S.; KODUKULA, K.; GALANDE, A.K. Robust substrate profiling method reveals striking differences in specificities of serum and lung fluid proteases. *Bio Techniques*. **2011**.50: In press.

WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D. H.; BEST, E. A.; OLINS, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. **1996**. Oct;7(5):494-9.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, **2007**.

WU, M.; ZHAO, L.; ZHU, L.; CHEN, Z.; LI, H. Expression and purification of chimeric peptide comprising EGFR B-cell epitope and measles virus fusion protein T-cell epitope in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. **2013**. Mar;88(1):7-12.

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

YAHY, N.; DEVAUX, C.; MANSUELLE, P.; DEFENDINI, M.L.; GRANIER, C. Monoclonal antibodies to toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*: further characterization of epitope specificities and neutralizing capacities. *Toxicon*. **1992**. Jul;30(7):723-31.

ZAMUDIO, F.; SAAVEDRA, R.; MARTIN, B.M.; GURROLA-BRIONES, G.; HÉRION, 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*. **1992**. Feb 15;204(1):281-92.

ZHANG, J. Z.; YAROV-YAROVY, V.; SCHEUER, T.; KARBAT, I.; COHEN, L.; GORDON, D.; GUREVITZ, M.; CATTERALL, W. A. Mapping the interaction site for a  $\beta$ -scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na<sup>(+)</sup> channels. *J Biol Chem*. **2012**. Aug 31;287(36):30719-28.

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

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

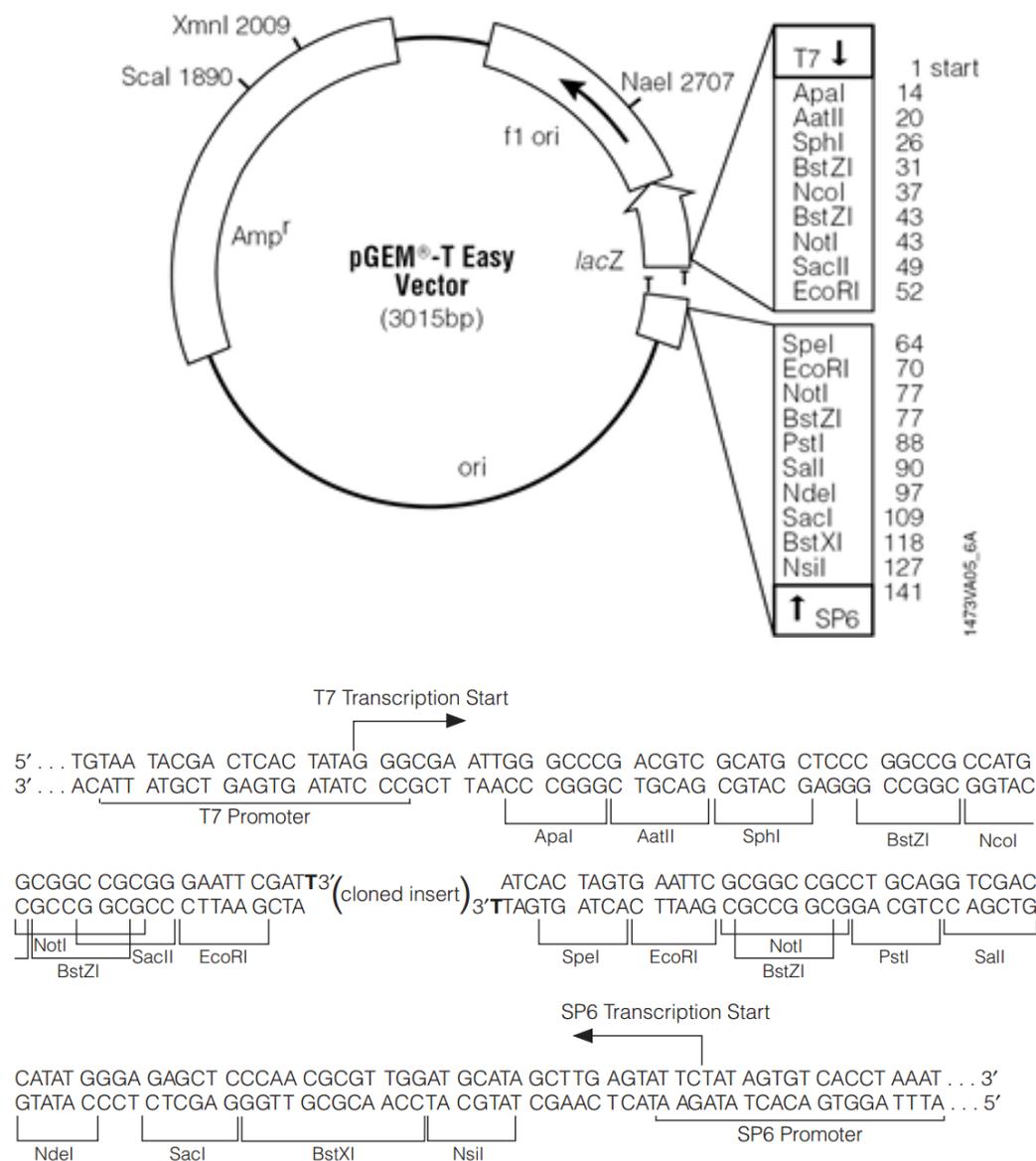
ZHU, X. Q.; LI, S. X.; HE, H. J.; YUAN, Q. S. On-column refolding of an insoluble His<sub>6</sub>-tagged recombinant EC-SOD overexpressed in *Escherichia coli*. *Acta Biochim Biophys Sin*. **2005**. Apr;37(4):265-9.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, **1965**. pp. 97-166.

ZITKA O, KUKACKA J, KRIZKOVA S, HUSKA D, ADAM V, MASARIK M, PRUSA R, KIZEK R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*. **2010**. 17(31):3751-68.

# Anexos I

## Mapas dos vetores utilizados



**Figura 23: Mapa do vetor pGEM-T-Easy com seu MCS em evidência.**

Mapa do vetor pGEM-T-Easy exibindo suas regiões do gene de resistência a ampicilina ( $Amp^r$ ), origens de replicação ( $ori$  e  $f1 ori$ ) e gene  $lacZ$  onde está inserido o sítio múltiplo de clonagem (MCS) e a região de ligação do produto de PCR. No detalhe do MCS, notamos o local de ligação do produto de PCR marcado com (cloned insert).



# Anexos II

## Sequências proteicas da quiméra e das proteases em fasta com indicação dos domínios

>TsQ3

MKKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCCKKADSGYCYVWHILCYCYGLPDSSEPTKTNGKCKSMDEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGREC  
GIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNKLEGREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPDSVKIWTSE  
TNKCGLEHHHHHH

Ts3

Ts1

TsNTxP

His-tag

>Metalloserrulase\_1, TsMS\_1, KM115016

MISYLASIFLLATVSAVPSGRVEVVFPSVETSRSRGVTKVFTALDQDVELKLRSAEILGKRFQVDVDESLLRRIYRDSVNGAALLIDEDGP  
LTIEGIVNSKLRIQPFESGRITKDGIIAHQIVEVIDDKKSYDRVAVIPENVKRNAENVSRMARDDDCIVVEYYIVTDSAFTRKRFKNSALTNVY  
TVMFTGVQNLMDTLELIGVRLGVTTFTEKTEPSFIKDNLI PGPPAAFDPVLI SAMSYYCNHQTGLAKDIDLIFLITARGMDPREDGTVD  
INTAGIANSAGVCKPCFKSGIATDDSDYNERVDTLAHEVHLLGSPHDGEGPNLVSLESGPGAANCPAKAGYIMGNRNDKNKYKFSPTKKKVE  
YLLSKPTASCIFQQCSDF

Peptideo sinal

Própeptideo

Sitio Ativo

>Metalloserrulase\_2, TsMS\_2, KM115017

MQTMIFSLAYIILLATVSAIPSGRVDIVFPSLETSSRSVKIKFEALGQDIELNLEPAGEILAKDFAIVDLNNQREHLTNVEDLKRRIYRDSVK  
GAALLIDENGLTMQGIINSLRIVPYESGRVIKDGRIAHQIVELINDEKSYINDVMPLDVNGVMENVVKISKKSPCIIIDYLCVTETTFTERF  
KTNKELLEYITVMFTGVQNLDDTLNLGIKAQVIGITPFKKQNEPSFIEDSAIPGHQQVLDVLDVKNMAKYCNNAKGLAKDADIIMLISNRKL  
GELQDDGTVAYNTAGISLGSVCKQCSKVGVAQDDSDYNERVDVTAHETAHLLGAPHDGEGPEQTGISGSPGAKDCPESDGYIMGSGNNKVNKF  
KFSKCTKKCVEHLLSLPRASCVLADC

Peptideo sinal

Própeptideo

Sitio Ativo

>Metalloserrulase\_3, TsMS\_3, KM115018

MYTSLHDALPIDLFASVSAIPNGREDVVPFWETSRSAGKTVKFRALGEDIELKLEPAGDILAEGFALFDSKNQTKSSVDVENLRRIYRDSV  
NGAALLIDDEFLSIQIVNSKLRIAPHESRELNQYRRRAHRIVELTNDKNSLRDDVISRNIQRQIENFASMSREDKCI VESLVCVTESTRFTR  
RFKTNQALTEYVTLMFTGAQNMVDTMNLGIKRLIGVQAFAINTEPSFIKTNEVKNKYKFSILDDMNSYYCKNATGLAKDADIIMLITRIM  
VLMKGSQIENEAVGLALGGACLTCEKSLVMADETDYNERVITSLAHEAAHLLAVPHDGDGDFKVS DIPNSPGAKSCRYGEGYIMGTSIGPNMLKF  
SKCSIACAKYFLSLPQASCLYEDCPSSAY

Peptideo sinal

Própeptideo

Sitio Ativo

>Metalloserrulase\_4, TsMS\_4, KM115019

MFVVCISLLFCASVSAIPNGRREVYTPSLETLSRGIKIVKFRAGFEDIELKLEPAGDVISDNFTMKDNLGRIQTTDEKSLKSLRFLKAREKGAAL  
YINEDGFLKIKGVNSKLSIEPYNSDKMVKHGISAHVITESFAERKHFNDKVMNMLKKTFAKDNARIFNEDQCVSIKYLFLTDSNFRSGFPNP  
KDMETYFATMFILVQEDMDTLKLNIVSLIGIEPVKNETNFVKEVSLIPGEEVDFGHVVGNLNVLNCKYKDNELYKADSIMFITKRLGNREP  
DGSVSTNTLGVANLGGACNPKLKTGVIKDYGDMTLLANTVAHETAHQIGSPHDGEDAPYSLPGSPTGEKCPGSQGYLMGDSKGENKGFSPCTR  
ENVKFFLNKDEASCVVSAKSTV

Peptideo sinal

Própeptideo

Sitio Ativo



>Metalloserrulase\_10, TsMS\_10, KM115025

MDEKEQDFRINCQGDHEGNSSTNPRERLLIILAFIFLVLVLSLLCAIVISIAVESLLPKSGMCLSKDCVKKAGDILGNLNEEVNPCENFYSSYSCG  
 GWKNKNLLSLPGKSIFQEIQMKVYDQMYAFIQKINKDDGGIADKVAKITESCINHSTLVDKKPLKMSYDKLFSYGGFPLANVEEAGMTKIVKI  
 ANLYRLLGTEPIIRITVIPSDDKNKKNVLIAPPDPSVFSDDPRDIELAKKFLKSVYDIEANPILLKFDYVKTLYNNIKDKLAVEFKYKEEFIL  
 SNDKNKITLLGNFDFDEFISILLTKQEEKKKTFKKLIPSITVTPSTSTERTSESSSTEQFSDDTPTTDQLSTITIAQNKQLKRRRRNGDQKN  
 AGNENSVIEILVINPEVVKTVLELFLKENDETISNFLSIQFLKNIEDNNVMGLSNTQLSKHTISKYVEDGKIMKCLQDLSEHLIYAFDIYINN  
 TNVPSKEARDVVDHVKKALKSFVPAYSWLDDEHKKFVDSKLNEMNYFVGYPLWLSDKAQVQDYKDLNLNIEKSALVRRGSLDGDGSDENTGYA  
 DAGDGKDDADAGDEKDNDEENDADEEQPVDVDPVNDDDIKAKTTPYIEIYMDVMKFNKKLLEKLSVTNDRSSWPNIPAISITTVNAFYSS  
 QLNSIVVPAAILNPPIFDVNIPIFYLNFGSLGTVIGHEITHGFDTNKRKRDKGNIPEHSLWNQDTIKYNSSEAKCFEDQYSTYSIGTLKVNGTK  
 TLAENIADNGAINEALSQYRYWLSEHNKGRKENSPLGLDSFTHEQLFFISVAQSWCHTANRKYLKELIETDEHTPNQFRVKGSLSNSKEFSEVF  
 ECENGGKPMNPTKKCKLW

Peptideo sinal

Própeptideo

Sitio Ativo

>Metalloserrulase\_11, TsMS\_11

MIFSLYTLAYLIILFVINTGKVQALSNAQLKYFELLDTADISHSIIKRGIHPSYHRYNTIKEVSKALGRYFRLILNPTQGLSSRFKAYTVDG  
 LGNKQPVVWVKQFPEGRVFGKNSVTAHIDNGLITAAIRTPEPTYIIEPSWRHLSDDNNSMIIYRGSVDKFSWSDSHDDKNLPKFCSYVHE  
 DGNSSSEVYGDEVFNDQFKKINKRQAIDPVQTRCSLLLVADYRFYENMGGSNLKGTINFLISLIDRVNKIFLETEWQDNEKQPGFRGMGFIQEV  
 MVHTPESPVIHREKHYNMADVSNVNRDLELVFSRNVNHRWFLAHLFTDQRFDDGILGLAYVGSPPRHNSVGGICSPGYVKNYTYLYLNSGLSTS  
 RNHYAQRVITREADLVTAHFGINWSEHDPDIPDCSPDARHGGSYLMYTVSVNGYDPNNKFKSPCSIRSIKAVLLAKANKCFLKPEESFCGNS  
 LVEEGEECDAGLIGSEDNDPCCDTNCRLRPDVICSDKNAPCCRDCLVREREVCREAQQTACKQEAHCNGESPDCPPSSPQPNKTLCLDKGQCL  
 AGECI PFCETRDRHSCMCNREEDACKRCCRRTQNDTCDPIEPIEILRDGTPCIHGCEKGHCKKTVDIVERFWDLIEDININSVLKFLNDNIV  
 GTVVVISVIIWIPASCLISYVDRKRKEYKELMERRNKRQNILPFQAPSCKNTKIIHARRNRDNASLGHSTSHMGNNYRYSDRLYPRGSYR  
 PAVAAAEMSYPHYPYSHDPAKYNNVVRPQRYTHLRSSIGPADPRPLRVRPSIVEAYTAL

Peptideo sinal

Própeptideo

Sitio Ativo

Domínio Desintegrina

Domínio proximal de membrana

>Serine\_protease\_1, TsSP\_1

IYVNEETTTVPDDNSTAYNTTTSGYTEKNYQEDNFTTKNPVQTTDNDNDISSDRVTEDRNITTTIREFSTETTTTKTTSISSGGYQTDFRKVC  
 GRPNPIKIPNGRIYGGSTAEFGWPPWISLRQWKNTFLHKGAALLNEFWAITAAHCVVEGVPTTDILLRLGEYDLSTEEYLPYIERRVQLIA  
 SHPKFDRRTFEYDLALLRFYEPVPFQQNILPICVPTGNSYIGEFATVAGWRGLYEDGPLPKLQEVVPSVANKECEDMYRKAGYVEDIPDIF  
 ICAGLAKGGRISCEGDSGGPLVIKDDDDGRVWLAGIISWIGICALPNQPGVYTRITKFSEWINQIIIF

Sitio Ativo

## Anexos III

## Artigos completos publicados durante o período de doutorado

Artigos como primeiro autor.

Toxicon 90 (2014) 45–55



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland



A.O. Carmo<sup>a</sup>, B.B.R. Oliveira-Mendes<sup>a</sup>, C.C.R. Horta<sup>a</sup>, B.F. Magalhães<sup>a</sup>,  
A.E. Dantas<sup>a</sup>, L.M. Chaves<sup>a</sup>, C. Chávez-Olórtegui<sup>b</sup>, E. Kalapothakis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica – Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 May 2014

Received in revised form 10 July 2014

Accepted 24 July 2014

Available online 1 August 2014

## Keywords:

*Tityus serrulatus*  
Metalloprotease  
Metalloserrulase  
Venom  
Scorpion  
Envenomation

## ABSTRACT

*Tityus serrulatus* is a Brazilian scorpion species with great medical significance. While the effects of neurotoxins have been extensively studied, little is known about the proteases expressed in the venom gland of this arthropod. In this study, clones from a *T. serrulatus* (Ts) venom gland cDNA library were selected according to homology to proteases. The sequences were aligned in the database and classified by homology. Similarity and identity analyses of the sequences were carried out, and a phylogenetic tree was constructed with the sequences of other proteases. These cDNA sequences correspond to ten different metalloproteases, named metalloserrulases (TsMS). TsMS 1–9 belong to the metzincin family, which has three domains: signal peptide, propeptide, and metalloprotease domain; while TsMS 10 belongs to the gluzincin family. The proteolytic activity of the venom was inferred from the cleavage of fibrinogen, and the residues recognized by the proteases were determined by cleavage of a tripeptide library using a fluorescence resonance energy transfer assay. The Ts venom showed proteolytic activity on fibrinogen and preferential cleavage close to the basic residues K and R. Its activity could be inhibited by EDTA, indicating that the venom from this scorpion predominantly consists of metalloproteases.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

There are several scorpion species in Brazil, but only species from the *Tityus* genus may cause serious injury to humans (Soares et al., 2002). The Brazilian yellow scorpion *Tityus serrulatus* stands out for its large population,

parthenogenetic reproduction, high venom toxicity, and great adaptability to urban environments (Lourenço and Cloudsley-Thompson, 1999). The *T. serrulatus* population is more concentrated in cities, since the urban environment is one of its favorite niches, and causes numerous injuries due to its constant contact with humans (Torres et al.,

**Abbreviations:** MCA, 7-methoxycoumarin-4-acetic acid; TsMS, metalloserrulase; Ts, *Tityus serrulatus*; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DPA, N<sup>3</sup>-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionic acid; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; E-64, trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane.

\* Corresponding author. Instituto de Ciências Biológicas, Bloco E3, sala 179, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2701; fax: +55 31 3409 2713.

E-mail addresses: [anderson.o.carmo@gmail.com](mailto:anderson.o.carmo@gmail.com) (A.O. Carmo), [barbarabio2@gmail.com](mailto:barbarabio2@gmail.com) (B.B.R. Oliveira-Mendes), [carolinacampolina@yahoo.com.br](mailto:carolinacampolina@yahoo.com.br) (C.C.R. Horta), [barbara\\_fmagg@hotmail.com](mailto:barbara_fmagg@hotmail.com) (B.F. Magalhães), [arthurestanislau@gmail.com](mailto:arthurestanislau@gmail.com) (A.E. Dantas), [lucasdemeirachaves@hotmail.com](mailto:lucasdemeirachaves@hotmail.com) (L.M. Chaves), [olortegi@icb.ufmg.br](mailto:olortegi@icb.ufmg.br) (C. Chávez-Olórtegui), [ekalapo@icb.ufmg.br](mailto:ekalapo@icb.ufmg.br), [kalapothakis@gmail.com](mailto:kalapothakis@gmail.com) (E. Kalapothakis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.014>

0041-0101/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2002; Bortoluzzi et al., 2007; Ministério Da Saúde, 2001, 2009). *T. serrulatus* is broadly distributed in Brazil. In 2012, there were more than 63,000 accidents due to *T. serrulatus* in Brazil, representing 48% of all accidents involving venomous animals (Academia Brasileira de Ciências, 2010; Ministério da Saúde, SINAN, 2013). Depending on the severity of the case, scorpion envenomation may cause complications and lead to death. These animals are responsible for approximately 36% of deaths arising from accidents with venomous animals, demonstrating the importance of understanding scorpion envenomation in Brazil (Academia Brasileira de Ciências, 2010; Ministério da Saúde, SINAN, 2013).

*T. serrulatus* venom (Ts venom) is comprised of several substances such as mucus, salts, peptides, high molecular mass proteins, hyaluronidase, proteases, hypotensive peptides, nucleotides, lipids, and amino acids. Neurotoxins are considered the most toxic components of scorpion venom and are included in the peptide group. However, other protein components from the venom, such as hyaluronidases and proteases, also take part in the envenomation process (Gwee et al., 1996; Fukuhara et al., 2003; Cologna et al., 2009; Verano-Braga et al., 2008, 2010; Alvarenga et al., 2012; Horta et al., 2014).

Proteases can cleave proteins at specific locations based on the amino acid sequence, next to amino acid residues located at the N- or C-terminus, or randomly. Proteases are classified into four groups, according to the key amino acid (serine, cysteine, or aspartic acid) in the catalytic site or according to the need of a metallic ion to realize its function. These enzymes are important for cell metabolism; for example, they take part in the post-translational process of removing signal peptides and propeptides. Proteases can also act as toxins, which are well characterized in spider and snake venoms (Chaim et al., 2011; Serrano, 2013). Among the proteases described for venomous animals, metalloproteases are the most common. These proteases need a bivalent ion as a cofactor to have proteolytic activity (Markland and Swenson, 2013; Ortiz et al., 2014). The proteolytic function in scorpions is not clear because several species do not present evidence of these enzymes in their venom composition; however, recent studies have characterized proteases in scorpion venom (Costal-Oliveira et al., 2012; Venâncio et al., 2013; Ortiz et al., 2014).

In some accidents involving *T. serrulatus*, symptoms of acute pancreatitis have been observed (Possani et al., 1991; Fletcher et al., 1996; Ortiz et al., 2014). These symptoms are caused by the proteases that cleave proteins from the SNARE complex, which is responsible for the pancreatic vesicular transport from the cytoplasm to the cell membrane. Antarease is one of these proteases that has been described by Fletcher et al. (2010). It specifically cleaves the vesicle-associated membrane proteins (VAMPs) from the SNARE family. The cleavage of these proteins disrupts the transport of pancreatic vesicles to outside the organ, causing pancreatitis.

In Ts venom, the only protease that has been described is antarease; however, in this work, a great diversity of proteases revealed from the Ts venom gland cDNA library is presented. All sequences showed similarity and identity to a class of zinc-dependent metalloproteases, thus forming a

new family of scorpionic metalloproteases, which are named metalloserrulases (TsMS).

## 2. Methodology

### 2.1. Milking of venom

*T. serrulatus* scorpions were collected in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (19° 53.8' S, 43° 57.8' W) and kept in captivity for regular venom milking. The crude venom was collected by electrical stimulation and solubilized in 0.01% trifluoroacetic acid (Sigma–Aldrich). Approximately 500 scorpions were used. The venom was centrifuged at 16,000 × g and 4 °C for 10 min, and the supernatant was recovered. The soluble fraction was dosed using the Bio-Rad “Protein DC assay” kit (Lowry et al., 1951), and stored in the freezer at –20 °C until use.

### 2.2. cDNA library construction and protease clone identification

The cDNA library used in this study was described previously by Kalapothakis et al. (2001). The clones used in this work were identified as proteases by homology to the UniProt database using the BLASTx (Consortium, 2010; Alvarenga et al., 2012). DNA sequencing reactions were performed on both strands using M13 universal primers, and the sequences were grouped in contigs by CodonCode Aligner 4.0.

### 2.3. Bioinformatics analysis

Sequences were aligned using CodonCode Aligner 4.0 for contig formation and searched for similarity using the BLAST platform, including the BLASTx tool against the databank of nonredundant sequences. The cDNA sequences were transcribed *in silico* before the next analysis. The protein sequences were aligned among themselves using the ClustalW program in the MEGA 5 platform (Tamura et al., 2011). After the alignment, the similarity and identity percentages between the sequences were calculated. The primary sequence alignments of the proteases were visualized with the program Jalview 2.8 (Waterhouse et al., 2009). The sequences were analyzed to identify the signal peptide using the online program SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011), and the propeptide cleavage site was determined using the online program ProP 1.0 server (Duckert et al., 2004). Additionally, the antarease protein sequence deposited in the databank (P86392.2) was included in the alignment analysis for the identification of possible differences.

The sequence alignments were made using the MEGA 5 platform, and the tree was built with the neighbor-joining algorithm (Zuckerkanndl and Pauling, 1965; Tamura et al., 2011). The search for similar sequences was performed using the BLASTp tool in the UniProt database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A phylogenetic tree was constructed using the metalloproteases described in this work and also the ten most similar sequences to the TsMS 1 cDNA sequence in three different taxa: Arachnida (*Mesobuthus eupeus* ABR20110.1, ABR20111.1; *M. martensii* AHA36326.1;

*Haemaphysalis longicornis* BAE72663.1; *Ixodes scapularis* XP\_002410665.1, XP\_002416297.1, XP\_002411551.1; *Ixodes ricinus* CAO00625.1, CAO00626.1, and CAO00627.1; Insecta (*Nasonia vitripennis* XP\_003426006.1, XP\_001607602.1; *Apis florea* XP\_003690654.1; *A. mellifera* XP\_392978.3; *Ceratitis capitata* XP\_004520243.1, XP\_004520244.1; *Camponotus floridanus* EFN68352.1, EFN68351.1; *Acromyrmex echinator* EGI57486.1; *Megachile rotundata* XP\_003705693.1); and Ophidia (*Macrovipera lebetina* Q3ZD74.1, P83255.1, Q98995.1; *Bothrops atrox* C5H5D3.1; *B. asper* 1ND1\_A; *Lachesis muta rhombata* C5H5D6.1, C5H5D5.1; *Protobothrops flavoviridis* Q90Z13.1; *Gloydus halys* Q8AW15.1; *Ovophis okinavensis* BAN89403.1). In addition, the ten most similar sequences to TsMS 10 were searched without taxonomic distinction: (*Strongylocentrotus purpuratus* XP\_798822.3; *Capitella teleta* ELT99995.1; *Trichoplax adhaerens* XP\_002113430.1; *Drosophila mojavensis* XP\_002012368.1; *Pan troglodytes* BAK62694.1; *Vicugna pacos* XP\_006202893.1; *Camelus ferus* XP\_006188501.1; *Ciona intestinalis* XP\_002130786.2; *Branchiostoma floridae* XP\_002589136.1).

To determine the pairwise alignment of the mature primary TsMS sequences, the ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)“\t”\_blank) site was used, which generated similarity and identity percentages between the sequences. Sequences were considered mature after the removal of the propeptide and signal peptide. The clone for TsMS 10 did not present a propeptide or a signal peptide sequence.

#### 2.4. Fibrinogen cleavage

Fibrinogen from bovine plasma (0.5 mg/mL, Sigma–Aldrich) in Tris–HCl buffer (50 mM Tris–HCl pH 8.0; 150 mM NaCl, 2 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>) was used as the substrate solution. Whole Ts venom (3 µg) in 10 µL of substrate solution was incubated at 37 °C. The assay was interrupted by the addition of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) sample buffer containing reducing agent (100 mM Tris–HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol, and 20% glycerol), and incubated for 5 min at 100 °C. The visualization of cleavage was made in 12% SDS–PAGE gel (Laemmli, 1970). The proteolytic activity of the venom was evaluated in relation to the cleavage time at 1, 4, and 16 h. Class-specific protease inhibitors were tested [10 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 µM E-64, and 20 nM pepstatin A, all from Sigma–Aldrich]. After the cleavage assay, the samples were submitted to 12% SDS–PAGE.

#### 2.5. Screening of the metalloprotease cleavage site

The specificities of the Ts venom proteases were analyzed using a library of 3375 internally quenched fluorogenic peptide substrates divided into 512 microtiter plate wells (Mimotopes, Melbourne, Australia). This library has been previously validated through substrate specificity profiling of both purified recombinant proteases and complex biological fluids (Thomas et al., 2006; Watson et al., 2011). These probes remain optically silent in the uncleaved state, but upon cleavage they emit a fluorescence

signal with intensity proportional to the extent of cleavage. Peptides in this library contain the sequence MCA–G–G–G–1st–2nd–3rd–G–G–DPA–K–K, where MCA corresponds to 7-methoxycoumarin–4–acetic acid (fluorophore) and DPA corresponds to N<sup>b</sup>–(2,4-dinitrophenyl)–L–2,3-diaminopropionic acid (quencher). Two C-terminal lysine residues were included to improve the aqueous solubility of the hydrophobic sequences. The 1st, 2nd, and 3rd amino acids correspond to variable residues comprised of equimolar mixtures of A/V, D/E, F/Y, I/L, K/R, N/Q, S/T, or P. Thus, each well of the library contained an equimolar mixture of up to eight individual peptides. Excluded residues either are chemically incompatible (Cys, Met), interfere with fluorescence (Trp), or are rarely found in protease cleavage sites (His).

The peptides in each library well (5 nmol of total peptide per well) were dissolved in 5 µL of 50% acetonitrile in ultrapure water and further diluted in 45 µL of sterile-filtered Tris–HCl buffer (30 mM Tris–HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>). The Ts venom was diluted in this same buffer at a final concentration of 40 µg/mL (2 µg of Ts venom per well). After a blank measurement, 50 µL of the Ts venom–buffer solution was added to perform the assay.

Time-resolved fluorescence data were obtained on a Varioskan Flash multimode reader (Thermo Scientific) using excitation and emission filters of 320 nm and 420 nm, respectively, with readings taken every 2 min for 1 h at a constant temperature of 37 °C. To measure the fluorescence saturation and other nonspecific cleavage sites by the Ts venom proteases, the plates were sealed with a plate-sealing film and incubated in the dark for 48 h at 25 °C. The fluorescence values were calculated after subtraction of the blank readings.

### 3. Results

#### 3.1. Protease clone identification

A total of 1629 clones were sequenced to determine the transcriptome of the Ts venom gland. From this total, 36 were identified as metalloproteases, representing 2.2% of all sequenced transcripts.

The clones were identified using the BLASTx tool against a nonredundant databank, and then they were aligned. Ten protease sequences were found, forming five contigs (two or more sequences encoding the same protein) and five singlets (single sequence). The sequences were nominated as metalloproteases (TsMS), followed by a number. The distribution of clones and GenBank access code number is shown in Table 1.

#### 3.2. Identification of the TsMS domains

The deduced amino acid sequences of TsMS 1–9 were aligned with the mature sequence of antarease, a metalloprotease isolated from Ts venom by Fletcher et al. (2010) (P86392.2). This alignment presented similarities varying from 46% to 95%. TsMS 10 presented the highest primary sequence divergence (11–23% among all TsMS), indicating

**Table 1**  
Metalloprotease clone distribution in contigs and GenBank access code number.

Metalloprotease	Number of clones	GenBank Access code number
TsMS 1	4	KM115016
TsMS 2	14	KM115017
TsMS 3	1	KM115018
TsMS 4	1	KM115019
TsMS 5	5	KM115020
TsMS 6	1	KM115021
TsMS 7	1	KM115022
TsMS 8	3	KM115023
TsMS 9	1	KM115024
TsMS 10	5	KM115025
Total	36	

that this protease belongs to a different group of metalloproteases (Fig. 1).

Using the programs SignalP 4.1 and ProP 1.0, the presence of a signal peptide and a propeptide were identified in TsMS 1, 2, 4, 6, 7, 8, and 9. Full-length clones were not obtained for TsMS 3 or 5; however, the partial putative mature sequences are presented (Fig. 1A).

TsMS 1–9 present the conserved region H-E-x-x-H-x-x-G-x-x-H-D, which includes a zinc-binding site and the catalytic site, indicating that they belong to a metalloprotease class. They also present a conserved methionine, which is 25–35 amino acid residues away from the first histidine of the zinc-binding motif. This methionine is located in the hydrophobic loop that directs this residue to the catalytic site. The zinc-binding site along with the methionine loop is common to the metzincin family (Fig. 1A) (Bode et al., 1993; Hooper, 1994; Seals and Courtneidge, 2003). Metalloproteases have a conserved glycine residue in the catalytic site; however, TsMS 3 has a substitution of this glycine for an alanine (position 347 of the alignment, Fig. 1), which probably does not significantly alter the enzymatic activity of this protein.

Although TsMS 10 also presents a zinc-binding site, its pattern is different from the other nine TsMS (N-A/V-x-x-H-E-x-x-H/E-x-x-x-D/Y-A/H-x-x-x-x-R). This site is discontinuous, indicating that the three-dimensional conformation is the one responsible for the correct formation of the zinc-binding site (Fig. 1B). The alignment made using the nonredundant databank with the BLAST program indicates that TsMS 10 presents a high similarity with the gluzincin and M13 metalloprotease families (Rawlings and Barrett, 1995; Fernandez et al., 2001).

TsMS 1–9, but not TsMS 10, presented a conserved pattern of eight cysteine residues (Fig. 1A), suggesting that these enzymes may be stabilized by four disulfide bridges. In addition, TsMS 1, 2, 4, 6, 7, and 9 presented extra cysteines (1, 2, 1, 1, 1, and 1, respectively), which may not be related to the disulfide bridge formation.

The mature forms of TsMS 1, TsMS 2, and TsMS 3 showed, respectively, 95%, 70.9%, and 45.3% similarity with the *T. serrulatus* metalloprotease antarease (P86392.2), with TsMS 2 being the most predominant clone (Table 1). Fig. 1A shows the alignment TsMS 1–9 described in this work.

### 3.3. Phylogenetic tree

A total of 49 sequences were used to construct the phylogenetic tree, including the TsMS sequences described in the present study and 39 sequences coding for other proteases previously found in scorpions (3 sequences), ticks (7 sequences), snakes (10 sequences), insects (11 sequences), and others (8 sequences). The Arachnida sequences formed a single clade that included exclusively proteases isolated from *T. serrulatus*, i.e., TsMS 1–9 and antarease (P86392.2). The Insecta and Ophidia sequences formed another two individual clades, showing strong cohesion among the analyzed taxa. TsMS 10 was grouped in an outer clade from the other sequences, reinforcing that this enzyme belongs to a new metalloprotease family present in Ts venom (Fig. 2).

### 3.4. Identity/similarity analysis

Identity/similarity percentages analyses among the TsMS sequences are presented in Table 2. The mature proteins of TsMS 1 and TsMS 2 showed 56.7% identity (the identical amino acid in the same position in the primary sequence), while the similarity (the substitution of amino acids with similar biochemical properties) value was 73.5%. Table 2 shows the results for all ten TsMS sequences. Identity/similarity percentages were higher when the signal peptide and propeptide sequences were included in this analysis (results not shown).

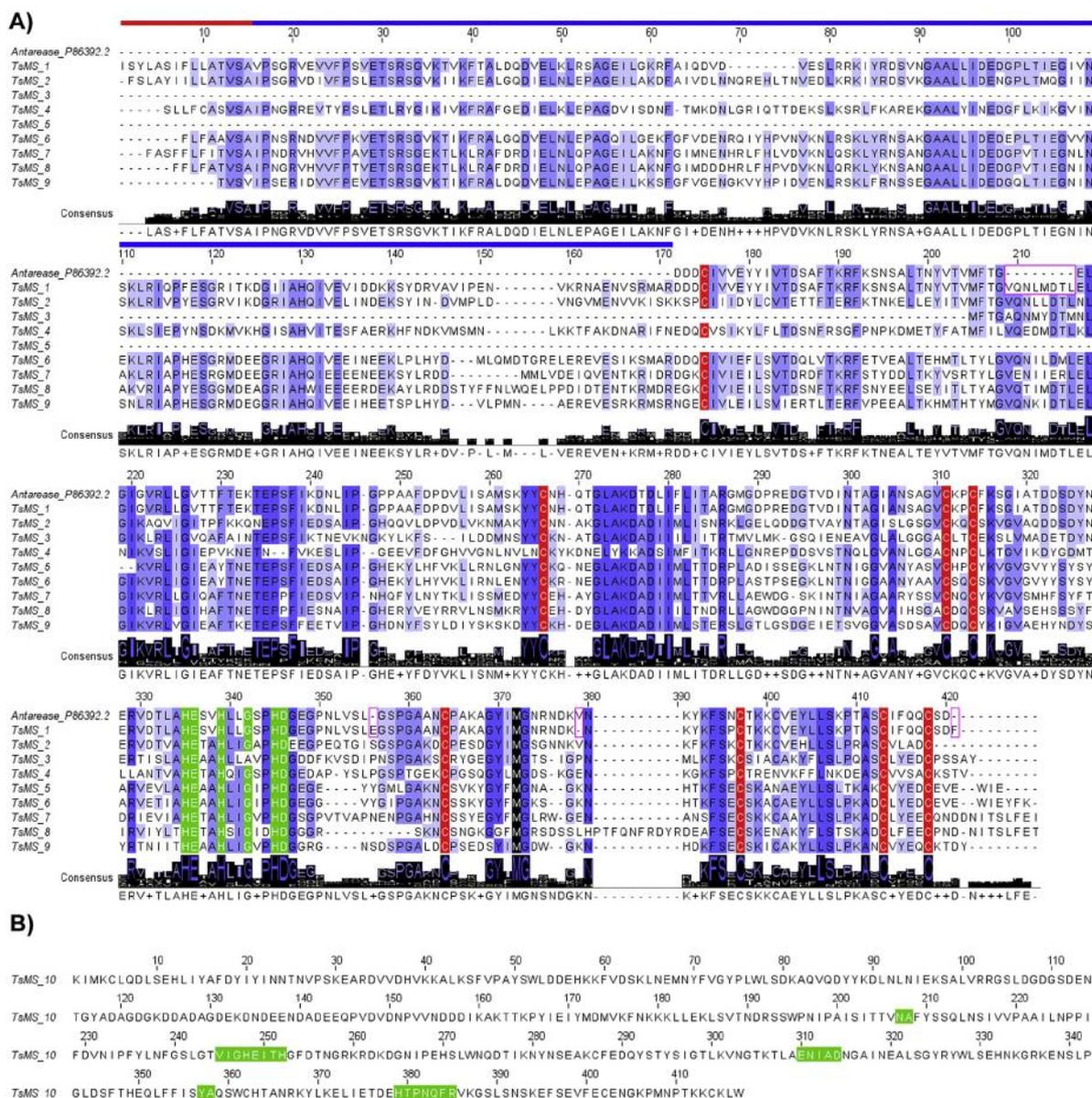
### 3.5. Fibrinogen cleavage

Cleavage of fibrinogen by crude Ts venom was observed by SDS-PAGE; in particular, cleavage was detected for the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of fibrinogen. Ts venom was capable of partially cleaving the  $\alpha$  chain in 1 h. In 4 h, it cleaved the whole  $\alpha$  chain and part of the  $\beta$  chain; and in 16 h, it completely cleaved both chains (Fig. 3A), showing that Ts venom has fibrinogenolytic activity.

In the class-specific protease inhibitor assay, the Ts venom was incubated with fibrinogen for 16 h. The inhibitors EDTA (metalloprotease inhibitor), PMSF (serine protease inhibitor), E-64 (cysteine protease inhibitor), and pepstatin A (aspartic acid protease inhibitor) were added to the venom before incubation with the substrate. Only EDTA was capable of partially inhibiting the proteolytic digestion caused by the venom, suggesting that the venom has predominantly metalloproteases (Fig. 3B).

### 3.6. Screening of the TsMS cleavage site

The enzyme kinetics reaction identified only six wells with an increase in fluorescence after incubation for 1 h with Ts venom (Fig. 4A). As described in the Methods section (REPLi kit), the sequence of the analyzed peptides was MCA-G-G-G-1st-2nd-3rd-G-G-DPA-K-K. The peptides presented in these six wells had the following amino acids for the 1st, 2nd, and 3rd positions: A/V, K/R, and K/R (well 10); K/R, K/R, and K/R (well 74); N/Q, K/R, and K/R (well 202); I/L, K/R, and K/R (well 266); P, K/R, and K/R (well 330); and S/T, K/R, and K/R (well 394). These results showed the



**Fig. 1.** Alignment of metalloserrulases and antirease A) The alignment was performed with the mature protein sequences of TsMS 1–9 and antirease (P86392.2) using the program Jalview 2.8. The blue color indicates similarity between sequences, and the darker color intensity indicates a greater similarity between the regions. The consensus sequence is indicated. The red horizontal line indicates the signal peptide for TsMS 1–9. The horizontal blue line indicates the presence of a propeptide of approximately 150 amino acid residues. Residues in green indicate the zinc-binding site conserved in TsMS 1–9 and antirease (HExhHxxCxxHD). The methionine present on the Met-loop site is highlighted in black. The eight conserved cysteines for TsMS 1–9 and antirease are highlighted in red, indicating that these enzymes can be stabilized by four disulfide bridges. The differences between the primary sequences of TsMS 1 and antirease are highlighted in transparent boxes. B) Sequence of TsMS 10 shows a discontinuous zinc-binding site, also highlighted in green (N-A/V-x-x-H-E-x-x-H/E-x-x-x-x-D/Y-A/H-x-x-x-x-R). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

constant presence of lysine or arginine residues at positions 2 and 3 and a variable amino acid at position 1. The wells that showed a high fluorescence signal had the following combinations as the first amino acid: A/V, K/R, N/Q, and P. The wells that showed a low fluorescence signal in the kinetics assay had I/L or S/T residues in position 1. Some of these sites identified above (RRK, PRK, TRR, QKK, IRK, and

PRK) are present in the primary sequence of bovine fibrinogen. In addition to the peptides identified during the enzyme kinetics assay, another 20 wells showed an increase in fluorescence after incubation for 48 h. With this period of time, the cleaved peptide sequences were variable. The predominant residues found at the first position

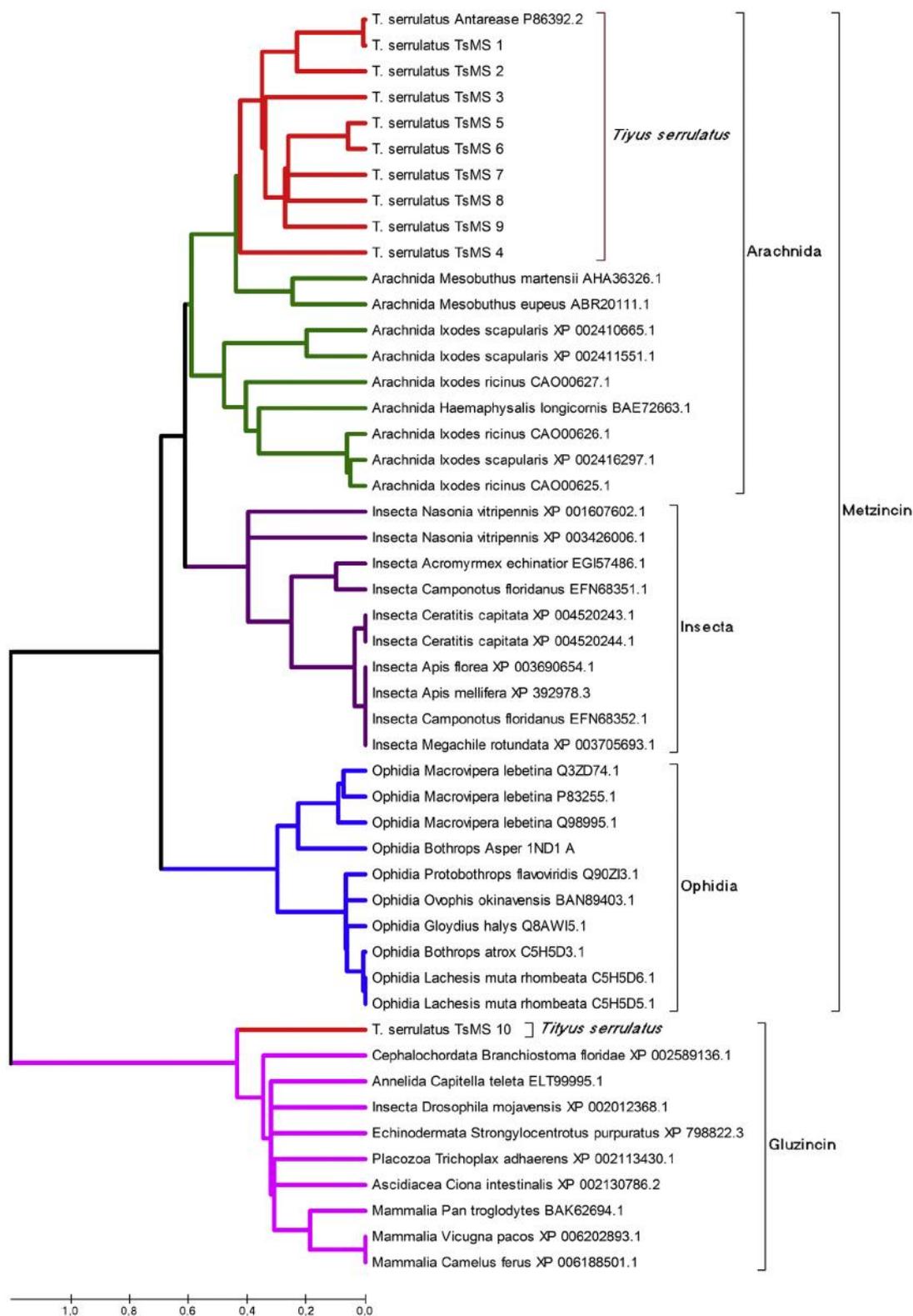


Fig. 2. Phylogenetic tree of *T. serrulatus* metalloproteases and other metalloproteases. The tree was constructed with sequences having the greatest similarity with the deduced protein sequence of TsMS 1. Searches were conducted using a nonredundant database of sequences between the taxa Arachnida, Insecta, and

**Table 2**  
Identity (gray – lower) and similarity (white – upper) percentages of the TsMS mature sequences.

	TsMS 1	TsMS 2	TsMS 3	TsMS 4	TsMS 5	TsMS 6	TsMS 7	TsMS 8	TsMS 9	TsMS 10
TsMS 1		73.5	48.8	54.7	44.6	60.5	61.1	51.9	63.0	19.1
TsMS 2	56.7		51.7	55.1	47.7	63.7	60.2	57.0	61.1	17.3
TsMS 3	38.1	37.9		44.7	51.7	49.4	49.2	45.3	48.8	17.5
TsMS 4	38.7	40.1	29.3		41.6	51.2	49.6	46.7	50.2	23.3
TsMS 5	35.0	36.5	37.7	30.5		71.0	54.0	48.0	57.2	15.8
TsMS 6	46.1	48.6	36.6	35.0	67.6		71.9	64.7	74.5	11.3
TsMS 7	44.1	43.8	35.8	31.9	44.0	59.3		70.2	70.4	17.7
TsMS 8	38.0	37.9	32.8	31.3	36.9	50.4	55.8		59.0	19.4
TsMS 9	44.1	46.0	39.2	33.5	42.8	56.9	52.6	46.5		13.0
TsMS 10	10.7	10.9	9.1	14.9	10.0	5.9	9.9	12.4	8.6	

were I/L, K/R, and N/Q, representing 74% of the total residues at this position. The second and third positions showed less variation in the amino acid composition, with the predominant presence of lysine or arginine with 53% and 37%, respectively (Fig. 4B). It was observed that proteolytic cleavage occurred rather close to basic residues and that the amino acid lysine or arginine was present in 79% of the peptides present in the wells that had secondary cleavage. The amino acid residues found after substrate incubation with Ts venom proteases for 48 h confirmed the data acquired in the kinetics assay, in which the second and third amino acid residues were lysine or arginine showing that these proteases preferably recognize basic residues as cleavage sites.

#### 4. Discussion

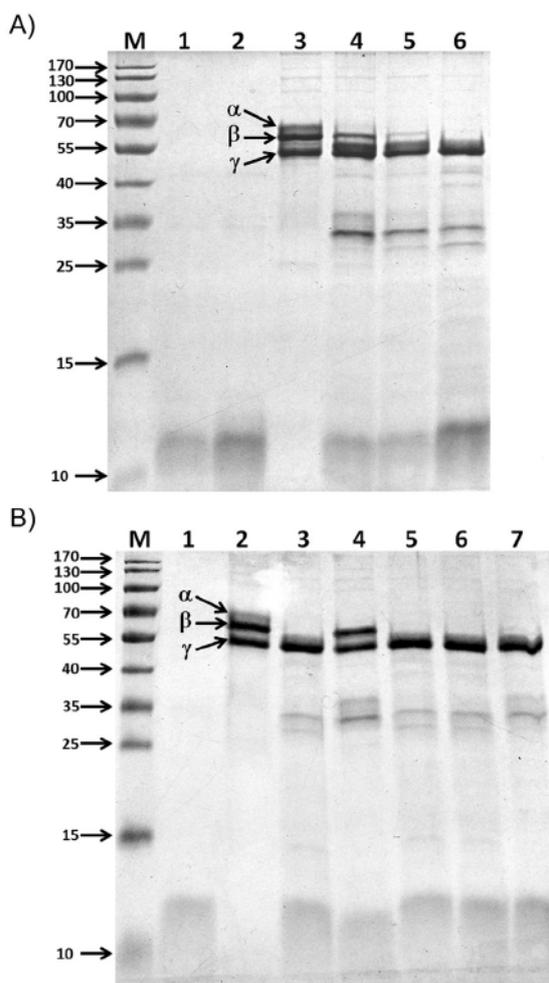
The transcriptome of the venom gland from scorpions has brought to light several new venom components such as neurotoxins and enzymes like hyaluronidases, proteases, and phospholipases (Almeida et al., 2002; Fletcher et al., 2010; Seyedian et al., 2010; Costal-Oliveira et al., 2012; Verano-Braga et al., 2013; Horta et al., 2014). In this work, the sequence details from ten new metalloproteases expressed by the venom gland of the yellow scorpion *T. serrulatus* are described. The metalloproteases are an important class of proteases that depend on a metallic atom to perform their full functionality. These enzymes are divided into several groups and families. The zinc metalloproteases are a very diverse group, and they are classified according to their zinc-binding site (Hooper, 1994). For example, the metzincin family has the zinc-binding site H-E-x-x-H-x-x-G-x-x-H-D and a hydrophobic loop with a methionine that forms a hydrophobic base for the binding between the histidine residues and zinc (Bode et al., 1993; Hooper, 1994; Stocker and Bode, 1995). This family has several members of snake venom metalloproteases (SVMPs), such as ADAMs (A Disintegrin and Metalloprotease), with different biochemical functions (Seals and Courtneidge, 2003). Besides this class, the gluzincin family stands out for having the zinc-binding site H-E-x-x-H/.....E. The glutamic acid residue, far from the

histidines, is the third ligand for the Zn atom and is approximately 24–64 residues from the catalytic site (Hooper, 1994). Proteases of the metzincin family are present in several animal venoms such as spiders and serpents (Chaim et al., 2011; Markland and Swenson, 2013). TsMS 1–9 presented high similarity with the proteases described in this family, while TsMS 10 presented high similarity with the gluzincin family. Due to the similarity with these metalloprotease classes, these novel proteases were named metalloserrulases (TsMS) for *T. serrulatus* metalloproteases.

The TsMS sequences were obtained from a venom gland cDNA library; the mRNA for the library was obtained 2 days after venom milking by electroshock treatment (Guatimosim et al., 1999; Kalapothakis et al., 2001). The protease clones represented 2% of the total 1629 sequenced clones with a positive match, which does not discard the possibility of the existence of other protease families that have not yet been studied. However, the transcriptome analysis was made in an amplified library; therefore, the relative amount of transcripts may be different from that found in this study, since some clones might have been preferentially amplified.

The primary structures of these enzymes showed the presence of a signal peptide and a propeptide, the typical protein structure also found for the neurotoxins expressed by this venom gland (Kalapothakis et al., 2001). The propeptide may serve as an inhibitor, and its removal is related to the full activation of enzymes and toxins (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990; Becker et al., 1995; Anders et al., 2001; Loechel et al., 1998; Kang et al., 2002). Fletcher et al. (2010) purified the protease antarease from Ts venom, a 25-kDa enzyme; this mass matches those of the mature TsMS 1–9 forms whose deduced amino acid sequences have the following masses: TsMS 1, 25.64 kDa; TsMS 2, 25.51 kDa; TsMS 3, 22.06 kDa; TsMS 4, 26.07 kDa; TsMS 5, 20.67 kDa; TsMS 6, 26.48 kDa; TsMS 7, 27.57 kDa; TsMS 8, 27.53 kDa; TsMS 9, 25.92 kDa; and TsMS 10, 47.45 kDa. The immature TsMS proteins showed an average molecular mass of 43 kDa (data not shown), including the propeptide and signal peptide. In serpents, propeptide processing in the lumen of the venom gland can ensure that the other venom

Ophidia. Proteases of these groups showing strong similarities are in the same clade, with separate branching for each taxa, and are indicated by different colors. Due to the sequence differences, TsMS 10 was also used as a basis for searching the database. From this search, ten different sequences were selected and used to make this phylogenetic tree. The tree shows that TsMS 1–9 belong to the metzincin family, while TsMS 10 belongs to the gluzincin family. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 3.** Fibrinogen degradation by *T. serrulatus* venom. The degradation of fibrinogen by Ts venom was determined by 12% SDS-PAGE. A) M, molecular weight marker; 1, 3 μg of Ts venom; 2, 5 μg of Ts venom; 3, 5 μg of fibrinogen, arrows indicate the chains α (63.5 kDa), β (56 kDa), and γ (47 kDa). Lanes 4–6, degradation of 5 μg of fibrinogen per 3 μg of Ts venom after incubation for 1, 4, and 16 h, respectively. The diffuse bands with low molecular weight Ts venom correspond mainly to neurotoxins. The amount of venom used in the assay was insufficient to provide high-mass bands that included the proteases. B) Inhibition assay of class-specific Ts venom proteolytic activity. Ts venom (3 μg) was incubated for 16 h with 5 μg of fibrinogen with a class-specific protease inhibitor at the appropriate concentration. M, molecular weight marker; 1, 3 μg of Ts venom; 2, 5 μg of fibrinogen; arrows indicate the chains α (63.5 kDa), β (56 kDa) and γ (47 kDa). Lane 3: incubation of 3 μg of Ts venom with 5 μg of fibrinogen; lane 4: positive control assay; lane 5: 10 mM EDTA; lane 6: 2 mM PMSF; lane 7: 20 μM E-64; lane 8: 20 μM pepstatin A.

components are not degraded. This processing is interesting, since these proteases may have activity on the *extracellular matrix* (Hite et al., 1992; Grams et al., 1993; Jia et al., 1996; Siigur et al., 1996).

TsMS 1–9 are related with the ADAM family proteases, belonging to the metzincin class of metalloproteases commonly found in serpents and directly involved in poisoning, degrading tissues, and affecting the blood coagulation process (Seals and Courtneidge, 2003). In

general, such symptoms are not observed in scorpion stings, except for a few species such as *Hadruroides lunatus* (Costal-Oliveira et al., 2012). For *T. serrulatus*, venom disruption of the extracellular matrix and blood coagulation problems are not observed because the proportion of proteases and/or the protease activity in the scorpion venom is much lower.

The gluzincin protease family, of which TsMS 10 belongs, is involved in several biological processes, such as the conversion of angiotensin I into angiotensin II (Hooper, 1994). This protease family includes thermolysin, neprilysin, endopeptidase-24.11, angiotensin-converting enzyme, and aminopeptidase metalloproteases, which are found in mammals and bacteria (Hooper, 1994). Among the gluzincin subfamilies, TsMS 10 resembles endopeptidase-24.11 as they have similar amino acid patterns at their catalytic site. This subfamily has N-endopeptidase activity, with preferential cleavage at hydrophobic amino acids (Le Moual et al., 1991; Bland et al., 2008). The specificity of gluzincin family proteases for hydrophobic amino acids suggests that TsMS 10 has important post-translational modification activity, such as cleaving the signal peptide from venom components.

To determine the proteolytic activity of the venom, a fibrinogen digestion assay was performed. To detect the proteolytic activity, it was necessary to use more than 3 μg of venom, a huge amount when compared to the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) for mice, which is 12.14 μg per 20 g of mouse weight (Mendes et al., 2008). Bello et al. (2006) characterized the proteolytic activity of the *Bothrops leucurus* serpent venom using the fibrinogen cleavage assay. Proportionally to our assay, they used 31 times less venom, considering the venom/substrate (w/w) ratio.

The assay was performed with fibrinogen (Fig. 3), and it was observed that the Ts venom had proteolytic activity on the fibrinogen α and β chains. Proteolytic activity on casein was also detected (data not shown). The proteolytic activity was partially inhibited with the addition of EDTA; the trace activity might be due to some residual TsMS activity or activity from another class of proteases. However, no other class-specific protease inhibitor was able to detectably inhibit the proteolytic activity in the fibrinogen assay. Specific inhibitors for metalloproteases, serine proteases, cysteine proteases, and aspartic acid proteases were used. Thus, if there are any other non-metalloproteases in the venom, they may be in a much lower concentration than the TsMS enzymes and/or not active on fibrinogen. Brazón et al. (2014) showed fibrinogenolytic activity in *Tityus discrepans* venom and suggested the presence of metalloproteases and serine proteases in this venom. The presence of serine protease in scorpion venoms is also indicated by other authors (Gao et al., 2008; Louati et al., 2011). Other studies with Ts venom have detected proteolytic activity with substrates such as bovine gelatin B by zymography, VAMP-2 and VAMP-8 by peptide proteolysis, and fluorescence resonance energy transfer substrate peptide Abz-FLRRV-EDDnp (Almeida et al., 2002; Fletcher et al., 2010; Venancio et al., 2013) reinforcing the data found in this study.

The presence of venom components with partial post-translational processing suggests a strong relationship between the toxin maturation process and protease activity

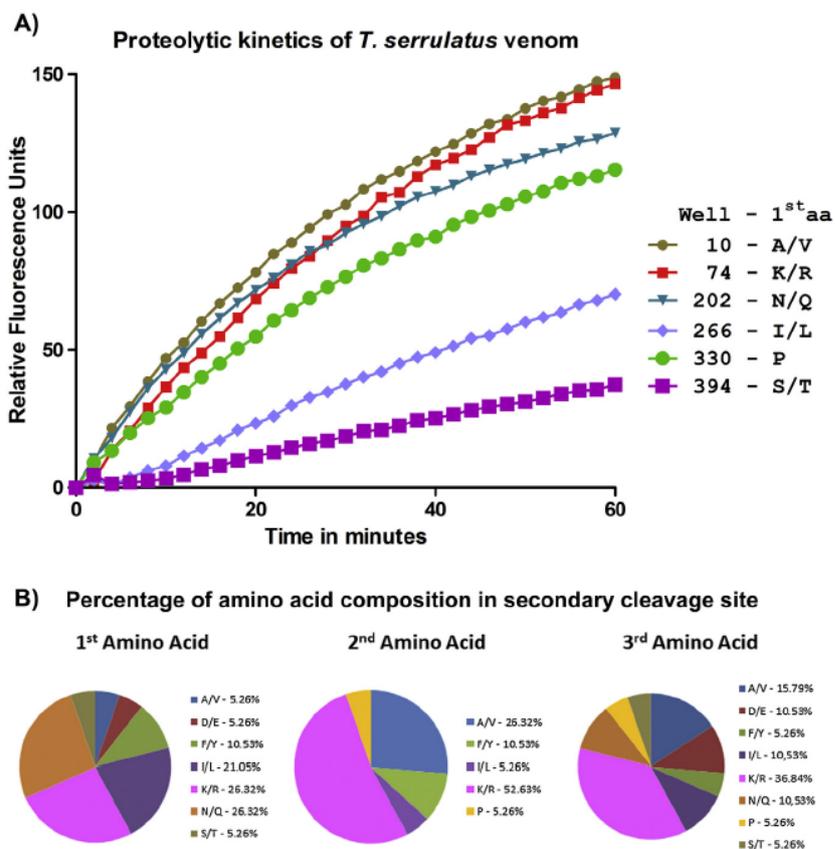


Fig. 4. Screening of the substrate cleavage site by metalloproteases and the kinetics of proteolysis. The substrate cleavage site specificity by the *Ts* venom proteases was determined with a REPLi kit. A) The kinetics assay showing only the reactive wells within 1 h of incubation. All wells have K/R in the second and third positions. The first amino acids are highlighted in the figure legend, beside the reference kit number. B) Identification of the secondary cleavage site (incubation for 2 h) by the *Ts* venom proteases. The graphics show the percentages of each amino acid found in the first, second, and third positions.

with the cleavage site close to a basic K or R residue. Most toxins have a lysine residue as the first amino acid and GKK at the C-terminus. Martin-Eauclaire et al. (1994) described the LD<sub>50</sub> variation in mice treated with the toxins TsIII, TsIV, and TsV (currently named Ts3), which present different sequences at the C-terminus. While the precursor of these toxins has the sequence GKCKSGKK at the C-terminus, the TsV toxin has GKCKSGK, with an LD<sub>50</sub> of 0.2 µg with subcutaneous injection (SC); the TsIV toxin has GKCKS, with an LD<sub>50</sub> of 0.4 µg SC; and the TsIII toxin has GKC, with an LD<sub>50</sub> of 2.5 µg SC. The remaining primary sequence is the same for all of these toxins, illustrating the importance of post-translational modifications made by proteases.

Peptidomic studies from scorpion venom have shown a high diversity of peptides that originate from the degradation of a larger protein (Rates et al., 2008). These findings suggest that a few of the gland's transcripts can lead to a variety of peptides after post-translational modifications. One of the causes for such modifications is the protease activity from the venom gland (Verano-Braga et al., 2013). The TsMS diversity found may indicate different specificities for certain active sites.

The work by Fletcher et al. (2010) presents evidence that the metalloprotease antarease may be responsible for the pancreatitis observed in some cases of envenomation by *T. serrulatus*. They found that the cleavage sites of VAMP-2 and -8 proteins, recognized by antarease, were close to residues KRK and RK, respectively, reinforcing the results found in this study. This fact suggests that these enzymes can also be a target of investigation for the production of antiscorpionic serum. The discovery of which proteases might have specific harmful effects to people stung by a scorpion, along with other components such as neurotoxins, could improve the quality of the produced serum (Chávez-Olórtegui et al., 1997; Guatimosim et al., 2000; Machado De Avila et al., 2004; Alvarenga et al., 2005; Mendes et al., 2008; Duarte et al., 2010). The results would provide better protection and counteract symptoms triggered by the components that are not neurotoxins.

### 5. Conclusion

In this work, ten new enzymes produced by the venom gland of the scorpion *T. serrulatus* were identified and

partially characterized. This diversity of metalloproteases in the venom strengthens a new area of research on scorpion venom and its potential impacts on poisoning cases as well as the evaluation of the inclusion of these enzymes in specific treatments for those injured, including the production of antiserum.

### Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Grant Numbers: Edital Toxinologia 63/2010; and PNPD AUXPE 2262/2011), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Grant Number: APQ-00202-13).

### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.014>.

### References

- Academia Brasileira de Ciências, 2010. Doenças negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Almeida, F.M., Pimenta, A.M., De Figueiredo, S.G., Santoro, M.M., Martin-eauclaire, M.F., Diniz, C.R., De Lima, M.E., 2002 Jul. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 40 (7), 1041–1045.
- Alvarenga, É.R., Mendes, T.M., Magalhães, B.F., Siqueira, F.F., Dantas, A.E., Barroca, T.M., Horta, C.C., Kalapothakis, E., 2012. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open. J. Genet.* 2, 210–220.
- 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., 2005. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 46 (6), 664–671.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., Fahrenholz, F., 2001. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* 15, 1837–1839.
- Becker, J.W., Marcy, A.I., Rokosz, L.L., Axel, M.G., Burbaum, J.J., Fitzgerald, P.M., Cameron, P.M., Esser, C.K., Hagmann, W.K., Hermes, J.D., et al., 1995. Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci.* 4, 1966–1976.
- Bello, C.A., Hermogenes, A.L., Magalhaes, A., Veiga, S.S., Gremski, L.H., Richardson, M., Sanchez, E.F., 2006 Feb. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie* 88 (2), 189–200.
- Bland, N.D., Pinney, J.W., Thomas, J.E., Turner, A.J., Isaac, R.E., 2008 Jan 23. Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. *BMC Evol. Biol.* 8, 16.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X., Stocker, W., 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXGXHX and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 331, 134–140.
- Bortoluzzi, L.R., Querol, M.V.M., Querol, E., 2007. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neo Trop.* ISSN: 1676-0603 7 (3), 357–359 [online].
- Brazón, J., Guerrero, B., D'suze, G., Sevcik, C., Arocha-Piñango, C.L., 2014 Feb. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 168, 62–69.
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., DA Silveira, R.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011 Mar. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins (Basel)* 3 (3), 309–344.
- Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., Ferreira, A.M., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35 (2), 213–221.
- Cologna, C.T., Marcussi, S., Giglio, J.R., Soares, A.M., Arantes, E.C., 2009. *Tityus serrulatus* venom and toxins: an overview. *Protein Peptide Lett.* 16, 920–932.
- Consortium, T.U., 2010. The universal protein resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res.* 38, D142–D148. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp846>.
- Costal-Oliveira, F., Duarte, C.G., Machado De Avila, R.A., Melo, M.M., Bordon, K.C., Arantes, E.C., Paredes, N.C., Tintaya, B., Bonilla, C., Bonilla, R.E., Suarez, W.S., Yarleque, A., Fernandez, J.M., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2012 Oct. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon* 60 (5), 934–942.
- Duarte, C.G., Alvarenga, L.M., Dias-Lopes, C., Machado-DE-Avila, R.A., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C., 2010 Feb 3. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine* 28 (5), 1168–1176. Epub 2009 Nov 28.
- Duckert, P., Brunak, S., Blom, N., 2004 Jan. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng. Des. Sel.* 17 (1), 107–112.
- Fernandez, M., Liu, X., Wouters, M.A., Heyberger, S., Husain, A., 2001 Feb 16. Angiotensin I-converting enzyme transition state stabilization by HIS1089: evidence for a catalytic mechanism distinct from other gluzincin metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 276 (7), 4998–5004.
- Fletcher, P.L., Fletcher, M., Fainter, L.K., Terrian, D.M., 1996 Nov–Dec. Action of new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon* 34 (11–12), 1399–1411.
- Fletcher, P.L.J.R., Fletcher, M.D., Weninger, K., Anderson, T.E., Martin, B.M., 2010 Mar 5. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Biol. Chem.* 285 (10), 7405–7416.
- Fukuhara, Y.D., Reis, M.L., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q., Donadi, E.A., 2003. Increased plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41 (1), 49–55. E. A.
- Gao, R., Zhang, Y., Gopalakrishnakone, P., 2008 Aug 1. Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch). *Toxicon* 52 (2), 348–353.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L., Bode, W., 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* 335, 76–80.
- Guatimosim, S.C.F., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Chávez-Olórtegui, C., 2000. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon* 38 (1), 113–121.
- Guatimosim, S.C.F., Prado, V.F., Diniz, C.R., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., 1999. Molecular cloning and genomic analysis of TsNtXP: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 37, 507–517.
- Gwee, M.C.E., Gopalakrishnakone, P., Cheah, L.S., Wong, P.T.H., Gong, J.P., Kini, R.M., 1996. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 15, 37–57.
- Hite, L.A., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1992. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin E from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrinlike structures. *Biochemistry* 31, 6203–6211.
- Hooper, N.M., 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354, 1–6.
- Horta, C.C., Magalhães, B.D.E.F., Oliveira-Mendes, B.B., DO Carmo, A.O., Duarte, C.G., Felicori, L.F., Machado-De-Avila, R.A., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., 2014 Feb 13. Immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2), e2693.
- Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* 34, 1269–1276.
- Kalapothakis, E., Jardim, S., Magalhaes, A.C., Mendes, T.M., DE Marco, L., Afonso, L.C., Chávez-Olórtegui, C., 2001. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 39, 679–685.

- Kang, T., Zhao, Y.G., Pei, D., Susic, J.F., Sang, Q.X., 2002. Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. *J. Biol. Chem.* 277, 25583–25591.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Le Moual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P., Boileau, G., 1991 Aug 25. Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J. Biol. Chem.* 266 (24), 15670–15674.
- Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U.M., 1998. Human ADAM 12 (meltrin- $\alpha$ ) is an active metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 273, 16993–16997.
- Louati, H., Zouari, N., Miled, N., Gargouri, Y., 2011 Jul. A new chymotrypsin-like serine protease involved in dietary protein digestion in a primitive animal, *Scorpio maurus*: purification and biochemical characterization. *Lipids Health Dis.* 21 (10), 121.
- Lourenço, W.R., Cloudsley-Thompson, J.L., 1999. Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae). *J. Arachnol.* 27, 154–158.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Machado De Avila, R.A., Alvarenga, L.M., Tavares, C.A., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2004. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon* 44 (3), 233–241. Sep. 1.
- Markland, F.S.J.R., Swenson, S., 2013 Feb. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 62, 3–18.
- Martin-Eauclaire, M.F., Céard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E., 1994 Apr 4. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* 342 (2), 181–184.
- Ministério Da Saúde, 2001. Escorpionismo. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.), Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, Escorpionismo, Brasília, pp. 39–47.
- Mendes, T.M., Dias, F., Horta, C.C., Pena, I.F., Arantes, E.C., Kalapothakis, E., 2008 Dec 1. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon* 52 (7), 787–793.
- Ministério da Saúde, 2009. Manual de controle de escorpiões. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília.
- SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), Ministério da Saúde, Brasil. Available for consultation at the following internet address. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/animaisp/bases/animaisbrnetdef>. (accessed 15.04.13.).
- Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Rego, S.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2014 Jun. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (6), 1738–1746.
- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2011 Sep 29. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8 (10), 785–786. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Fletcher, M.D., Fletcher, P.L.J.R., 1991 Feb 15. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266 (5), 3178–3185.
- Rates, B., Ferraz, K.K., Borges, M.H., Richardson, M., De Lima, M.E., Pimenta, A.M., 2008 Oct. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. *Toxicon* 52 (5), 611–618.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1995. Evolutionary families of metalloproteases. *Methods Enzymol.* 248, 183–228.
- Seals, D.F., Courtneidge, S.A., 2003 Jan 1. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17 (1), 7–30. Review.
- Serrano, S.M., 2013 Feb. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19–26.
- Seyedian, R., Pipelzadeh, M.H., Jalali, A., Kim, E., Lee, H., Kang, C., Cha, M., Sohn, E.T., Jung, E.S., Rahmani, A.H., Mirakabady, A.Z., 2010 Sep 15. Enzymatic analysis of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom using zymography and venom-specific antivenin. *Toxicon* 56 (4), 521–525.
- Siigur, E., Aaspollu, A., Tu, A.T., Siigur, J., 1996. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of fibrinolytic enzyme (lebetase) from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 229–236.
- Soares, M.R.M., Azevedo, C.S., Maria, M., 2002. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35 (4).
- Stocker, W., Bode, W., 1995. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 383–390.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011 Oct. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10), 2731–2739.
- Thomas, D.A., Francis, P., Smith, C., Ratcliffe, S., Ede, N.J., et al., 2006. A broad-spectrum fluorescence-based peptide library for the rapid identification of protease substrates. *Proteomics* 6, 2112–2120.
- Torres, J.B., Marques, M.G.B., Martini, R.K., Borges, C.V.A., 2002. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Rev. Saúde Pública.* 36 (5), 631–633. ISSN 0034-8910.
- Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H., 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 5578–5582.
- Venâncio, E.J., Portaro, F.C., Kuniyoshi, A.K., Carvalho, D.C., Piddiqueiroz, G., Tambourgi, D.V., 2013 Jul. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon* 69, 180–190.
- Verano-Braga, T., Dutra, A.A., León, I.R., Melo-Braga, M.N., Roepstorff, P., Pimenta, A.M., Kjeldsen, F., 2013 Jul 5. Moving pieces in a venom puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. *J. Proteome Res.* 12 (7), 3460–3470.
- Verano-Braga, T., Figueiredo-Resende, F., Melo, M.N., Lautner, R.Q., Gomes, E.R., Mata-Machado, L.T., Murari, A., Rocha-Resende, C., Elena De Lima, M., Guatimosim, S., Santos, R.A., Pimenta, A.M., 2010 Dec 15. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): a new agonist of B(2) kinin receptor. *Toxicon* 56 (7), 1162–1171. Epub, Apr. 22.
- Verano-Braga, T., Rocha-Resende, C., Silva, D.M.R., Ianzer, D., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., De Lima, M.E., Santos, R.A.S., Pimenta, A.M.C., 2008. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 515–520.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25 (9), 1189–1191. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- Watson, D.S., Jambunathan, K., Askew, D.S., Kodukula, K., Galande, A.K., 2011 Aug. Robust substrate profiling method reveals striking differences in specificities of serum and lung fluid proteases. *Bio Tech.* 51 (2), 95–104.
- Zuckerklund, E., Pauling, L., 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., Vogel, H.J. (Eds.), *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, pp. 97–166.

## MITOGENOME ANNOUNCEMENT

Complete mitochondrial genome sequence of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae)Anderson Oliveira do Carmo<sup>1</sup>, Pedro Ferreira Pinto Brandão Dias<sup>1</sup>, Ana Paula Vimieiro Martins<sup>1</sup>, Alessandra Gomes Bedore<sup>2</sup>, and Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil and <sup>2</sup>Companhia Energética de Minas Gerais S/A, CEMIG, Estação Ambiental Volta Grande, Conceição das Alagoas, MG, Brasil

## Abstract

*Prochilodus lineatus* (curimba) is an important Brazilian freshwater migratory fish with substantial economic importance in fishing. The complete mitochondrial genome of *P. lineatus* is 16,699 bp and contains 13 protein-coding genes (PCGs), 2 rRNA genes, 22 tRNA genes and one control region (D-loop). The mtDNA of *P. lineatus* is the first mitogenome of the Prochilodontidae family to be fully characterized. All of the PCGs in the mtDNA use the standard ATG start codon, with the exception of *Cox1* that utilizes the GTG start codon. Six of the 13 PCGs contain TAA stop codons, two contain the incomplete stop codon TA– (*Atp6* and *Nd6*), and five contain the incomplete stop codon T– (*Nd2*, *Cox2*, *Nd3*, *Nd4* and *Cytb*).

## Keywords

Complete mtDNA, curimba, next generation sequencing

## History

Received 23 September 2014

Accepted 26 September 2014

Published online 20 October 2014

The freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), commonly known as the curimba, is a member of the Prochilodontidae family (Characiformes, Anostomidae). *Prochilodus lineatus* naturally inhabits the Paraná-Paraguai basin and the Paraíba do Sul River. From a commercial perspective, *P. lineatus* is one of the most important fish in the Grande River (Castro & Begossi, 1995). Curimba can weigh up to 6 kg and reach 60 to 70 cm, although most individuals are 30 to 40 cm in length. *Prochilodus lineatus* migrates upstream to reproduce in the rainy season (from November to March) and is the most studied potamodromous fish in the neotropics.

Curimba display iliophagous feeding habits, what means it feeds moving the river substrate to eat algae, crustacean larvae and other organisms in the mud. This behavior makes the curimba a very important species for the ecosystem and economic subsistence (Castro & Vari, 2003; Yazbeck & Kalapothakis, 2007). Within the Characiformes order, Prochilodontidae is the only family lacking a complete published mitochondrial genome sequence. This lack of a published sequence has hindered the inclusion of Prochilodontidae in important phylogenetic studies (Nakatani et al., 2011).

The DNA was extracted from the muscle tissue of a *P. lineatus* individual collected from the Grande River, Minas Gerais, Brazil (20°01'53.8" S, 48°13'27.5" W). A genomic library was constructed and sequenced via MiSeq (Illumina, San Diego, CA) technology using a paired-end 250 bp strategy. The assembly was produced using Mira 4.0 (San Francisco, CA) (Chevreux et al.,

1999). The full mitochondrial genome was 16,699 pb in length (GenBank accession number KM245045), solved with 296× coverage. The mtDNA displayed a GC content of 44%, with individual base frequencies of 30% A, 16% G, 26% T and 29% C. The genome was annotated using the MitoFish webserver: <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/annotation/input.html> (Iwasaki et al., 2013) and contained 2 rRNA, 22 tRNA and 13 protein-coding genes (PCGs).

Genes in *P. lineatus* were arranged similarly to those in a typical vertebrate mitogenome. The *Cox1* gene contained the GTG start codon, and all other PCGs displayed the usual ATG start codon. Six of the 13 PCGs contained a TAA stop codon (*Nd1*, *Cox1*, *Atp8*, *Nd4L*, *Nd5* and *Nd6*); five displayed the T– incomplete stop codon (*Nd2*, *Cox2*, *Nd3*, *Nd4* and *Cytb*); and two displayed the TA– incomplete stop codon (*Atp6* and *Cox3*). The T– and TA– codons were completed during posttranscriptional polyadenylation (Ojala et al., 1981).

A 1041-bp control region, or displacement loop (D-loop), was located between the tRNA<sup>Pro</sup> and tRNA<sup>Phe</sup> loci (Table 1). Seven of the 22 tRNAs (tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Ser2</sup> and tRNA<sup>Glu</sup>) and one PCG (*Nd6*) were encoded on the light (L) strand. The remaining genes were encoded on the heavy (H) strand (Table 1). All tRNAs ranged from 67 to 75 bp in length, and each folded into a typical secondary structure. Some genes presented overlapping coding sequences (tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Gln</sup> and rRNA<sup>Met</sup>; *Atp8*, and *Atp6*; *Nd4L* and *Nd4*; *Nd5*, *Nd6*, and tRNA<sup>Glu</sup>; tRNA<sup>Thr</sup> and tRNA<sup>Pro</sup>), most of which overlapped by a single base.

Correspondence: Evanguedes Kalapothakis, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. Tel: +55-31-3409-2701. Fax: +55-31-3409-2713. E-mail: kalapothakis@gmail.com

Table 1. Annotation of mtDNA of *P. lineatus*.

Gene	Position		Size (bp)	Codon			Strand
	From (bp)	To (bp)		Amino acid	Start codon	Stop codon	
tRNA <sup>Phe</sup>	1	68	68				H
12S rRNA	69	1020	952				H
tRNA <sup>Val</sup>	1021	1092	72				H
16S rRNA	1093	2771	1679				H
tRNA <sup>Leu2</sup>	2772	2846	75				H
<i>Nd1</i>	2847	3821	975	324	ATG	TAA	H
tRNA <sup>Ile</sup>	3830	3901	72				H
tRNA <sup>Gln</sup>	3900	3970	71				L
tRNA <sup>Met</sup>	3970	4038	69				H
<i>Nd2</i>	4039	5083	1045	348	ATG	T--	H
tRNA <sup>Trp</sup>	5084	5155	72				H
tRNA <sup>Ala</sup>	5158	5226	69				L
tRNA <sup>Asn</sup>	5228	5300	73				L
tRNA <sup>Cys</sup>	5332	5398	67				L
tRNA <sup>Tyr</sup>	5400	5470	71				L
<i>Cox1</i>	5472	7019	1548	515	GTG	TAA	H
tRNA <sup>Ser2</sup>	7020	7090	71				L
tRNA <sup>Asp</sup>	7096	7168	73				H
<i>Cox2</i>	7183	7873	691	230	ATG	T--	H
tRNA <sup>Lys</sup>	7874	7948	75				H
<i>Atp8</i>	7950	8117	168	55	ATG	TAA	H
<i>Atp6</i>	8108	8790	683	227	ATG	TA-	H
<i>Cox3</i>	8791	9575	785	261	ATG	TA-	H
tRNA <sup>Gly</sup>	9576	9647	72				H
<i>Nd3</i>	9648	9996	349	116	ATG	T--	H
tRNA <sup>Arg</sup>	9997	10,066	70				H
<i>Nd4L</i>	10,067	10,363	297	98	ATG	TAA	H
<i>Nd4</i>	10,357	11,737	1381	460	ATG	T--	H
tRNA <sup>His</sup>	11,738	11,806	69				H
tRNA <sup>Ser1</sup>	11,807	11,874	68				H
tRNA <sup>Leu1</sup>	11,876	11,948	73				H
<i>Nd5</i>	11,949	13,787	1839	611	ATG	TAA	H
<i>Nd6</i>	13,784	14,302	519	172	ATG	TAA	L
tRNA <sup>Glu</sup>	14,303	14,371	69				L
<i>Cytb</i>	14,377	15,517	1141	378	ATG	T--	H
tRNA <sup>Thr</sup>	15,518	15,589	72				H
tRNA <sup>Pro</sup>	15,589	15,658	70				H
D-loop	15,659	16,699	1041				N/A

H, heavy strand; L, light strand.

### Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. This study has received funding from agreement number 4020000572 – GT455 CEMIG, Peixe Vivo. CEMIG Contract number 4570011274/510.

### References

- Castro F, Begosi A. (1995). Ecology of fishing on the Grande River (Brazil): Technology and territorial rights. *Fisheries Res* 21: 361–73.
- Castro RMC, Vari RP. (2003). Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ, editors. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs. p 65–70.
- Chevreaux B, Wetter T, Suhai S. (1999). Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Comp Sci Biol* 99: 45–56.
- Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, Yamada K, Maeda Y, Satoh Tp, Sado T, et al. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Mol Biol Evol* 11:2531–40.
- Nakatani M, Miya M, Mabuchi K, Saitoh K, Nishida M. (2011). Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeian origin and Mesozoic radiation. *BMC Evol Biol* 11:177.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290:470–4.
- Yazbeck Gm, Kalapothakis E. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genet Mol Res* 6:1026–34.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Review

## Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production

A.O. Carmo<sup>a</sup>, M. Chatzaki<sup>b</sup>, C.C.R. Horta<sup>a</sup>, B.F. Magalhães<sup>a</sup>, B.B.R. Oliveira-Mendes<sup>a</sup>, C. Chávez-Olórtegui<sup>c</sup>, E. Kalapothakis<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil<sup>b</sup> Department of Molecular Biology & Genetics, Democritus University of Thrace, University Campus, 69100 Komotini, Greece<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 June 2014

Received in revised form

10 November 2014

Accepted 17 February 2015

Available online 18 February 2015

## Keywords:

Scorpion

Antivenom

Immunization

Venom

Serum neutralization

Scorpionism

## ABSTRACT

Scorpionism represents a serious public health problem resulting in the death of children and debilitated individuals. Scorpion sting treatment employs various strategies including the use of specific medicines such as antiserum, especially for patients with severe symptoms. In 1909 Charles Todd described the production of an antiserum against the venom of the scorpion *Buthus quinquestriatus*. Based on Todd's work, researchers worldwide began producing antiserum using the same approach *i.e.*, immunization of horses with crude venom as antigen. Despite achieving satisfactory results using this approach, researchers in this field have developed alternative approaches for the production of scorpion antivenom serum. In this review, we describe the work published by experts in toxinology to the development of scorpion venom antiserum. Methods and results describing the use of specific antigens, detoxified venom or toxins, purified toxins and or venom fractions, native toxoids, recombinant toxins, synthetic peptides, monoclonal and recombinant antibodies, and alternative animal models are presented.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

## 1.1. Biologic generalities

Scorpions inspire fear due to their venomous sting as well as to their fearful appearance. On the other hand, they also inspire fascination, due to their imposing behavior and predatory habits. They were venerated by ancient Egyptians and sacred to Isis, the goddess of rebirth. Having adapted to terrestrial ecosystems over the last 425 million years they represent one of the best-adapted terrestrial arthropods occupying most tropical and temperate zone habitats without alterations to their anatomy over time and

between species (Beccaloni, 2009). Irrespective of genetic divergence, their morphology has not undergone great variation, basically corresponding to 3 ecomorphological patterns mostly relating to the substratum type (*i.e.*, lithophilic, psammophilic, and pelophilic scorpions) (Beccaloni, 2009), body size, and the combinational armor: large palps vs. reduced telson/weak venom and vice versa (Mebs, 2002; Prendini and Wheeler, 2005).

According to an updated and reliable internet site operated by Jan Ove Rein (<http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/index.php>), there are more than 2000 extant species comprising 195 genera and 15 families. Of these, only about 25–50 species (according to various resources *e.g.*, <http://scorpion.amnh.org> and <http://www.who.int/emc/amr.html>; Chippaux and Goyffon, 2008) are considered to be of medical importance. With the exception of only one species which belongs to the Hemiscorpiidae family (*Hemiscorpius lepturus*) endemic to Iran, Iraq, Pakistan, and Yemen (Chippaux and Goyffon, 2008; [http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/h\\_lepturus.htm](http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/h_lepturus.htm)), all other scorpion species posing serious danger to humans belong to the family Buthidae. Genera that draw the most attention in many countries and in relevant literature due to the morbidity

\* Corresponding author. Instituto de Ciências Biológicas, Bloco E3, Sala 179, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail addresses: anderson.o.carmo@gmail.com (A.O. Carmo), maria.chatzaki@gmail.com (M. Chatzaki), carolinacampolina@yahoo.com.br (C.C.R. Horta), barbara\_fmaga@hotmail.com (B.F. Magalhães), barbarab.mendes@gmail.com (B.B.R. Oliveira-Mendes), olortegi@icb.ufmg.br (C. Chávez-Olórtegui), kalapothakis@gmail.com (E. Kalapothakis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.007>  
0041-0101/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

associated with their venoms are: *Centruroides* (North and Central America, Colombia), *Tityus* (South America), *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* (North Africa and Middle East), *Parabuthus* (South Africa), and *Mesobuthus* (India) (Chippaux and Goyffon, 2008; Beccaloni, 2009). However, not all species belonging to the above genera are dangerous to humans. For example, the venom of *Mesobuthus gibbosus* endemic to the Balkan Peninsula and Turkey is milder compared to that of *Mesobuthus tumulus* endemic to India (Beccaloni, 2009).

## 1.2. Scorpionism

Scorpionism is a neglected public health threat that refers to accidents associated with scorpion stings and is considered a serious health issue in developing countries (WHO, 2007). Reports describing accidents involving scorpion stings associated with greatest severity primarily originate from Central and South America, North Africa, the Middle East, and Southwest Asia (Chippaux and Goyffon, 2008).

The main symptoms associated with scorpion stings are intense local pain, sweating, tachypnea, tachycardia, agitation, pancreatitis, pulmonary edema, hemolysis, and necrosis (Espino-Solis et al., 2009; Borchani et al., 2011a, 2011b; Khattabi et al., 2011). The severity of scorpion envenomation depends on the body mass, sensitivity of the victims, the amount of venom injected, and the species of scorpion.

After snakebites, scorpion stings represent the primary source of human envenomation worldwide (Mebs, 2002; Espino-Solis et al., 2009). Scorpionism represents a serious public health problem mainly in North Africa, the Middle East, and Central and South America. However, in areas of the world where adequate care is available, the use of appropriate antivenoms and other medical care has resulted in impressive decreases in mortality rates (Chippaux et al., 2011; Chippaux and Goyffon, 2008).

The treatment of scorpionism aims to combat symptoms using analgesics and serotherapy. The effectiveness of the treatment is directly related to the amount of time that elapses between the accident and the administration of the antivenom. According to the Brazilian Ministry of Health, antivenom must only be administered intravenously by doctors in a hospital setting. The patient's vital signs must be constantly monitored, and any changes to the patient's clinical status requiring medical intervention must be rapidly performed by trained medical staff (Ministério da Saúde, 2001).

## 1.3. The epidemiology of scorpionism

### 1.3.1. Old world

Among North African countries, the highest rates of scorpionism originate in Tunisia (420 per 100,000 inhabitants) (Njah et al., 2001) resulting in 50 deaths/year (Mansour, 2001); although more recent reports indicate that Algeria may now have higher incidence rates (Chippaux et al., 2011). Incidence rates increase from north to south and between rural and urban communities (Chippaux and Goyffon, 2008). The most dangerous species in these parts of the world are *Androctonus australis*, *Androctonus mauritanicus*, *Androctonus aeneas*, *Leiurus quinquestriatus*, *Buthus occitanus*, and *Hottentota franzwernerii*. In sub-Saharan Africa, fewer cases of hospitalization and death have been reported (Bergman, 1997; Attamo et al., 2002) with most cases presenting during the summer in younger victims (Chippaux and Goyffon, 2008). Inadequate health systems, combined with the misuse or unavailability of antivenoms in these areas is associated with high mortality rates (Chippaux et al., 2011). A similar incidence pattern associated with a significant reduction in mortality rates was observed following

recent improvements to the health care system in the Middle East, for example, Saudi Arabia (Al-Sadoon and Jarar, 2003); however, high mortality rates still exist in rural settings (Mahaba, 1997). Due to sparse epidemiological data in India the number of scorpionism incidents are difficult to estimate; however, fatal accidents are regularly reported (unofficially) and are mostly due to *Mesobuthus tamulus* stings (Chippaux and Goyffon, 2008).

### 1.3.2. New world

In Latin America, incidence rates increase during summer months (Schenone and Fontecilla, 1998; De Roodt et al., 2003; Chowell et al., 2005) mostly in suburban areas (Celis et al., 2007; Schenone and Fontecilla, 1998), and involve primarily adults instead of children (Chowell et al., 2005; Celis et al., 2007). Due to the presence of many species adapted to urban habitats (e.g., *Tityus trivittatus*) many incidents occur in domiciles (De Roodt et al., 2003). In Mexico, incidence rates and scorpion sting severity is affected by location, that is, cases are more common in urban settings and in populations <2500 inhabitants (Celis et al., 2007) and they are more frequent in adults than in children (Chowell et al., 2005; Celis et al., 2007). Another factor affecting incidence rates is climate, with the majority of stings occurring at the end of the dry season (Chowell et al., 2005). Mortality in these areas has dramatically decreased over the last decades due to the availability of antivenom against *Centruroides* spp. (from 0.6 to 0.07 per 100,000 inhabitants) (Celis et al., 2007). Presently, mortality rates remain rather high in children younger than 5 years old and in elders older than 60 years old (Celis et al., 2007). In Mexico, species of the genus *Centruroides* are considered the most dangerous, while in the rest of Latin America species of the genus *Tityus* represent the highest risk for humans with many species inhabiting vast areas and many being endemic.

In most of the countries above fatal envenomations have dramatically decreased during the last decades due to widely used antivenoms available for the treatment of stings from different species. However, the rates of fatal envenomations vary significantly between regions, with some rural areas still reporting high mortality rates (e.g. 6803 stings and 6.6 deaths per 100,000 inhabitants annually in some rural places of the Andes) (De Sousa et al., 1996). *Tityus serrulatus* causes approximately 10,000 cases annually with 50% occurring in the state of Minas Gerais (Maria et al., 2005) where mortality reaches 1.1%, especially among children (Cardoso et al., 1995; Freire-Maia and Campos, 1989). *T. serrulatus* is well adapted to both rural and urban environments and is responsible for most envenomations reported in southeast and northeast Brazil where it is most common.

## 1.4. Scorpion venoms and their toxins

The toxic arsenal of scorpion venoms are composed mainly of neurotoxins that act on ion channels (i.e., sodium, potassium, calcium, and chloride channels). Toxins acting on sodium and potassium channels are considered the most toxic components of scorpion venom and show sequence similarity in their primary and tertiary structures. These toxins consist of one  $\alpha$ -helix and 2-3  $\beta$ -sheets stabilized by 3–4 disulfide bridges (Rodríguez de la Vega and Possani, 2005; Rodríguez de la Vega et al., 2010; Chugunov et al., 2013). However, some enzymes present in venom such as hyaluronidases, proteases, and phospholipases also contribute to symptoms associated with scorpion venom envenomation (Costal-Oliveira et al., 2012; Borchani et al., 2013; Venancio et al., 2013; Horta et al., 2014; Carmo et al., 2014).

Scorpion toxins acting on ion channels can be further classified based on the type of channels affected, pharmacological effects, and their primary sequences. Toxins acting on sodium channels are

classified as either  $\alpha$  or  $\beta$  toxins (Table 1) (Catterall, 1980; Jover et al., 1980; Billen et al., 2008). The  $\alpha$ -toxins are considered the most toxic scorpion venom component, acting on voltage-dependent sodium channels by blocking or slowing their inactivation (Kalapothakis and Chávez-Olortegui, 1997; Bosmans and Tytgat, 2007). By contrast,  $\beta$ -toxins facilitate channel opening (Pedraza Escalona and Possani, 2013). Toxins affecting potassium channels are more diverse and function by blocking or inactivating these channels. They are further classified into  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx,  $\gamma$ -KTx and  $\kappa$ -KTx in addition to their pharmacological action and the type of ion channel affected (Carbone et al., 1982; Possani et al., 1982 Bergeron and Bingham, 2012). Other neurotoxins have been also shown to affect chloride and calcium channels (Mouhat et al., 2004; Norton and McDonough, 2008).

In addition to neurotoxins, scorpion venoms contain enzymes such as hyaluronidase, proteases, and phospholipases. Hyaluronidases are capable of degrading hyaluronic acid (the major component of the extracellular matrix) and are associated with toxin dispersion through tissues (Pessini et al., 2001; Costal-Oliveira et al., 2012; Venancio et al., 2013). Proteases are poorly described and most scorpion species have no detectable protease activity (Venancio et al., 2013; Carmo et al., 2014). However, the venom of some species, such as that of *T. serrulatus* can display pancreatitis caused by the Antarease protease (Fletcher et al., 2010). The venom of *H. lepturus* represents the only described venom that causes hemolysis and dermonecrosis due to the action of the sphingomyelinase D heminecrosis (Borchani et al., 2011a, 2011b). The synergistic action of the various toxins in venom is responsible for diverse toxic effects resulting from scorpion envenomation.

### 1.5. Scorpion antivenom

Scorpion antivenom or antiserum has been produced following immunization of horses and by the isolation of venom immunoglobulin G (IgG). Venom-specific antibodies are purified from serum and Fab' or F(ab)'<sub>2</sub> fragments are generated and used clinically. The serum produced by Ezequiel Dias Foundation (Belo Horizonte, MG - Brazil) specific for *T. serrulatus* venom can

neutralize 1 mg of venom per 1 mL of antiserum (Table 2). The administration of a specific antivenom that neutralizes the circulating venom and can only be performed in hospitals by trained medical staff. Based on the classification of the accident the patient may receive up to 6 antitoxin vials (5 mL of serum) (De Rezende et al., 1995).

One alternative for commercially antivenins is the use of lyophilized antivenom in tropical and poor regions. The lyophilized antivenom has a great advantage of a longer preservation time and can be stored in ambient temperature. Nevertheless, it can be a problem in the resuspension; the solubility depends on how well it was freeze-dried (Theakston et al., 2003).

### 1.6. History of scorpion antivenom production in horses

The first scorpion antivenom was produced by immunizing horses with the venom of *Buthus quinquestriatus* endemic to Egypt by Todd in 1909. The scorpion venom used for immunization was extracted by maceration of the scorpion telson, resuspended in saline, centrifuged, and the liquid fraction used to immunize horses. Since immunized animals presented with various envenomation symptoms, including pain at the injection site, diarrhea, salivation, sweating, and tetany; venom was mixed with iodine prior to inoculation to minimize symptoms (Todd, 1909). Maurano (1915) developed the first Brazilian antivenom against *Tityus bahiensis* venom using Todd's procedure; however, the antiserum generated had poor neutralizing activity. It was not until 1917 that the first effective Brazilian antivenom was produced in horses against scorpion venom. It was developed by Vilela (1917) and by that time, *T. serrulatus* scorpion was considered as a lighter kind of *T. bahiensis* species which produced more toxic venom. Only in 1918 production of antivenom against Brazilian *Tityus* spp. venom was performed in large-scale (Lucas, 2003). The first generation of antivenoms was produced solely of blood plasma without cells. In the year of 1927, the immunoglobulins were purified from horse plasma for use in humans. Formulations comprised of purified antibodies had lower levels of contamination (i.e., blood proteins present in plasma or serum) thereby preventing the development

**Table 1**

Main toxic peptides of the venoms from medically important scorpions, geographical distribution of the genus, type and target of the toxins.

Distribution	Genus	Species	Toxin	Toxin type/Target	References
North Africa, Middle East	<i>Androctonus</i>	<i>A. australis hector</i>	AaH1	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Bougis et al., 1989
			AaH2	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	
			AaH3	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	
	<i>Leiurus</i>	<i>L. mauretanicus</i> <i>L. quinquestriatus hebraeus</i> <i>L. quinquestriatus quinquestriatus</i>	Amm5	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Rosso and Rochat, 1985
			Lqh2	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Sautière et al., 1998
			Lqq4	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Kopeyan et al., 1985
			Lqq5	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Kopeyan et al., 1978
<i>Buthus</i>	<i>B. occitanus tunetanus</i>	Bot3	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Benkhadir et al., 2004	
		Bot14	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Bouhaouala-Zahar et al., 1996	
Middle East	<i>Hottentota</i>	<i>H. judaicus</i>	U10-buthotoxin-Hj1a	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> Channel	Morgenstern et al., 2011
	<i>Hemiscorpius</i>	<i>H. lepturus</i>	Heminecrosis	Smase D/sphingomyelin	Borchani et al., 2011b
South Africa	<i>Parabuthus</i>	<i>P. granulatus</i> <i>P. transvaalicus</i>	Pg8	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	García-Gómez et al., 2009
			Birtoxin	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Inceoglu et al., 2001
India	<i>Mesobuthus</i>	<i>M. tamulus</i> <i>M. eupeus</i>	BTN	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> Channel	Sharma et al., 2006
			BeM9	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Volkova et al., 1984
Mexico	<i>Centruroides</i>	<i>C. noxius</i> <i>C. suffusus</i> <i>C. limpidus</i>	BeM14	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Volkova et al., 1984
			Cn2	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Zamudio et al., 1992
			Cn5	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Becerril et al., 1993
			Css2	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Martin et al., 1987
			ClI2	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Dehesa-Dávila et al., 1996
Brazil	<i>Tityus</i>	<i>T. serrulatus</i> <i>T. stigmurus</i> <i>T. bahiensis</i>	Ts1	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Barhaning et al., 1982
			Ts3	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Martin-Eauclaire et al., 1994
			Ts5	$\alpha$ /Na <sup>+</sup> channel	Arantes et al., 1994
			Tst1	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Becerril et al., 1996
			Tb1	$\beta$ /Na <sup>+</sup> channel	Becerril et al., 1996

**Table 2**

Lethal doses in mice of scorpion venoms from some dangerous species distributed worldwide, commercial scorpion antivenoms available and their neutralization capacities.

Scorpion species	Crude venom LD <sub>50</sub> mg/kg (route)	Mice strain	LD <sub>50</sub> reference	Antivenom targets	Commercial antivenom names	Neutralization capacity	Producer, Country
<i>A. australis hector</i>	0.185 (s.c.)	Swiss	Rochat et al., 1967	<i>Androctonus</i> ssp. + <i>Leiurus</i> ssp.	SCORPIFAV	50 LD <sub>50</sub> /mL	SANOPI PASTEUR S.A., France
<i>A. mauretanicus</i>	0.35 (s.c.)	C57/Black	Rosso and Rochat, 1985	<i>Androctonus</i> ssp. + <i>Leiurus</i> ssp.	Scorpion antivenom	<sup>a</sup>	Twyford Pharmaceuticals, Germany
<i>L. quinquestriatus</i>	0.356 (s.c.)	C57 B1/6	Miranda et al., 1970		Polyvalent scorpion antivenom	50 LD <sub>50</sub> /mL	National Antivenom and Vaccine Production Center, Saudi Arabia
<i>B. occitanus</i>	0.893 (s.c.)	C57 B1/6	Miranda et al., 1970				
<i>P. transvaalicus</i>	LD <sub>90</sub> 0.24 (i.c.v.)	Swiss	Inceoglu et al., 2006	<i>Parabuthus</i> ssp.	SAIMR scorpion antivenom	<sup>a</sup>	South African Vaccine Producers (Pty) Ltd., South Africa
<i>M. tamulus</i>	3.01 (s.c.)	Swiss	Lala and Narayanan, 1994	<i>Mesobuthus</i> ssp.	Antiscorpion venom	1 mg/mL <sup>c</sup>	Haffkine Biopharmaceutical Corporation Ltd., India
<i>M. eupeus</i>	0.18 (i.c.v.)	Swiss	Ozkan and Carhan 2008				
<i>C. noxius</i>	0.26 (i.p.)	Albino (local Mexican strain)	Dent et al., 1980	<i>Centruroides</i> ssp.	Alacramyn	30 LD <sub>50</sub> /mL	Instituto Bioclon, Mexico
<i>C. sculpturatus</i>	0.8 (s.c.)	Swiss	Pete et al., 1992				
<i>C. limpidus</i>	1.72 (s.c.)	BALB/cAnN	Padilla et al., 2003				
<i>T. serrulatus</i>	0.375 (i.v.)	<sup>a</sup>	Aranes et al., 1989	<i>Tityus</i> ssp.	Soro Antiescorpionico (FUNED)	1 mg/mL <sup>c</sup>	Fundação Ezequiel Dias, Brazil
<i>T. stigmurus</i>	0.773 (i.p.)	Outbred	Nishikawa et al., 1994		Soro Antiescorpionico (Butantan)	7.5 MLD <sup>b</sup>	Instituto Butantan, Brazil
<i>T. bahiensis</i>	1.062 (i.p.)	Outbred	Nishikawa et al., 1994				

LD<sub>50</sub>, lethal dose for 50 percent of the population (The LD<sub>50</sub> reference values of scorpion venoms may vary according to the inoculation route and mouse strain used in the assay).

<sup>a</sup> Data not available.

<sup>b</sup> Minimum lethal dose.

<sup>c</sup> Minimal capacity to neutralize 1 mg of crude venom (*T. serrulatus* for FUNED antiserum and *M. tamulus* for Antiscorpion Venomerum) per 1 mL of commercial antiserum. Antivenom references are available at: [http://www.toxinfo.org/antivenoms/Index\\_Product.html](http://www.toxinfo.org/antivenoms/Index_Product.html); <http://www.medicamentos.com.mx/doctm/15099.htm>; <http://vaccinehaffkine.com/proddetail.aspx?prodid=8>; [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7667062014&pldAnexo=2212273](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7667062014&pldAnexo=2212273).

of some adverse effects associated with serotherapy. To further eliminate symptoms associated with serotherapy, purified antibodies were subjected to pepsin cleavage to generate Fab fragments that could neutralize venom, minimizing adverse effects resulting from human antihorse antibody xeno-reactivity responses (Espino-Solis et al., 2009) (Fig. 1).

Using this approach antivenom sera production was improved worldwide. In addition to the classical protocols that used crude venom as antigen, newer approaches using detoxified venom, recombinant toxins or synthetic peptides have been developed in an attempt to improve the efficacy of antiserum; however, to the best of our knowledge none of these immunogens have been used in the production of commercial antiserum to date.

## 2. Alternatives to the production of scorpion antivenom

### 2.1. Immunization protocols using detoxified venom toxins

Detoxification describes a process of antiserum development using an attenuated immunogen. Venom detoxification is conducted before immunization as a means of maintaining the immunized animal healthy, thereby increasing life expectancy and reducing the suffering caused by immunization with crude venom. As already mentioned, successive immunizations using crude venom greatly weaken the health of the immunized animals and reduces their lifespan.

Venom detoxification was first described by Abbadi and Irunberry (1970) and carried out by adding methylene blue to the venom followed by exposure to strong artificial light. This reaction

generated singlet oxygen intermediates capable of oxidizing aromatic- or sulfur group-containing amino acid residues on the toxin that allowed the venom to maintain its antigenicity.

Other chemicals such as glutaraldehyde, formaldehyde, and iodine have also been used in toxin detoxification. Both glutaraldehyde and formaldehyde promote alkylation of toxin residues containing sulfhydryl, hydroxyl, carboxyl, and amine radical groups and iodine irreversibly binds to aromatic amino acids such as phenylalanine and tyrosine. Treatment with these substances reduced the toxicity 6–30 fold compared to the LD<sub>50</sub> observed using untreated, crude venom. Additionally, it also decreased the neutralization capacity of the elicited antibodies against the native toxins, since anti-scorpion neutralizing antibodies recognize structural conformation better than linear amino acid sequence (Possani et al. 1981; Heneine et al. 1986; Das Gupta et al. 1989; Kharrat et al., 1997; Heneine and Heneine, 1998; Kaabi et al. 2001; Machado de Ávila et al. 2004).

In addition to reducing toxicity, immunization with detoxified venom elicited immune responses that protected vaccinated animals from the toxic effects of subsequent challenges using native toxins or venoms (Possani et al., 1981; Heneine et al., 1986; Kharrat et al., 1997; Kaabi et al., 2001; Machado de Ávila et al., 2004). Delori et al. (1981) demonstrated decreased toxicity of fraction Aah G-50 from *A. australis* venom by acetylation using acetic anhydride that acetylates free hydroxyl groups. Lozano et al. (1994) proposed the reduction of disulfide bonds using thioredoxin reductase as a detoxification procedure for a wide range of toxins and venoms from bees (*Apis mellifera*), snakes (*Bungarus multicinctus*), and scorpions (*A. australis*). However, no immunological tests were

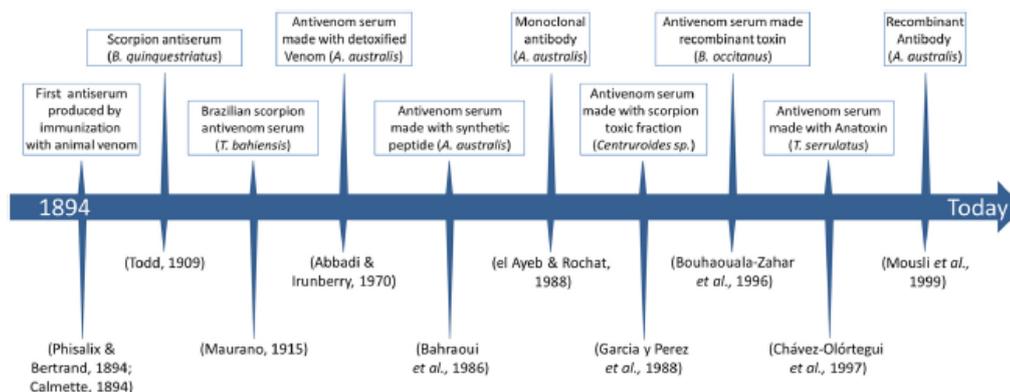


Fig. 1. The time line of scorpion antivenom development.

performed using these detoxified venoms so little can be gleaned regarding the efficacy of this detoxification approach since loss or alteration of the tertiary structure due to the absence of disulfide bonds would likely affect immunogenicity and impair the generation of antibodies against discontinuous epitopes required for the elicitation of effective neutralizing antibodies.

Liposomes have also been proposed as a means of attenuating venom toxicity. Liposomes are lipid bilayer vesicles that form a capsule that envelops target molecules. Liposome-encapsulated venom would be released at a slower rate, thereby avoiding exposure of the organism to high concentrations of venom at a single point in time during the immunization process. This would allow immunized animals to eliminate small doses of toxin over time, thereby reducing their toxicity. Chávez-Olórtegui et al. (1991) and Fonseca et al. (1997) used sphingomyelin-cholesterol liposomes to partially detoxify a toxic fraction of *T. serrulatus* venom obtained by Sephadex G-50 fractionation; however, the mouse's antivenom generated following immunization had a reduced neutralizing potential compared to that generated following immunization with the toxic non-encapsulated fraction. These data indicated that detoxification of venoms using liposome-based approaches requires additional studies and development. Abib and Laraba-Djebari (2003), and more recently Lila and Laraba-Djebari (2011) performed detoxification of *A. australis* venom using gamma radiation that in the presence of water generates free radicals that react with toxin residues rendering the venom non-toxic. These investigators reported a substantial reduction in the venom toxicity ( $LD_{50}$  25 times higher than the  $LD_{50}$  value obtained with untreated venom). In Brazil, gamma radiation has not yet been used in the generation of scorpion venom antiserum.

## 2.2. Immunization protocols using native toxic fractions

Scorpion venom is composed of various components including polysaccharides, amino acids, nucleotides, lipids, inorganic salts, proteins, and peptides the latter being considered the main toxic components (Gwee et al. 1996). Scorpion venom toxicity is primarily attributed to neurotoxic peptides with molecular weights ranging between 4.5 and 8 kDa (Borchani et al., 2011a, 2011b, 2013; Costal-Oliveira et al., 2012; Venancio et al., 2013). Despite the great diversity of components that comprise scorpion venom, most components are not associated with envenomation; however, these components are immunogenic and therefore are likely to elicit antibody production. However, despite their immunogenicity non-

toxic components typically do not elicit the production of antibodies capable of neutralizing crude venom. For this reason, using toxic fractions for immunization is more likely to generate neutralizing antibodies against the crude venom.

Venom fractions can be obtained by various methods, but separating respective venom components by size using Sephadex-G50 resin is frequently used as an initial first step. The fraction comprising peptides with molecular mass ranging between 4.5 and 8 kDa often corresponds to the most toxic fraction and therefore typically is used for immunization. Since this fraction is more lethal to the animals than crude venom it has to be used at lower concentrations that are typically inadequate at eliciting an immune response. It is also important to mention that some components from scorpion venoms have been described as immunosuppressive peptides (Shah et al., 2003; Varga et al., 2012).

Therefore, some studies describe the detoxification of this fraction so that it can be administered in greater amounts. García Y Pérez et al. (1988) generated rabbit's sera against toxic fractions obtained from the venoms of various *Centruroides* scorpions; however, the antiserum generated against the toxic fraction had poor neutralization capacity compared to antivenom generated following immunization with crude toxin. These authors previously showed similar results using toxic fractions from different scorpion venoms, therefore, the generation of antiscorpion serum is still carried out by immunizing with crude venom in the presence of adjuvants.

## 2.3. Immunization protocols using native anatoxins

Scorpion toxins possess similar sequences and are structurally similar (Chugunov et al., 2013). However, peptides referred to as anatoxins exist that possess sequences similar to those of toxins (including size and structure) but are not toxic to mammals. The possibility also exists that these compounds can affect other organisms (such as insects or crustaceans) or act on tissues and receptor targets different from those typically studied by researchers.

These peptides would therefore represent interesting antigens that could be used to generate antiserum since they are non-toxic to the host animal. Chávez-Olórtegui et al. (1997) described the production of antibodies against the TsNTxP anatoxin from *T. serrulatus*. The rabbit's anti-TsNTxP serum recognized epitopes present on major toxins and was able to neutralize *T. serrulatus* venom by neutralizing 20  $LD_{50}$  of venom per ml of serum. This result demonstrated the antigenicity of the TsNTxP anatoxin,

including a recombinant form, as described by Guatimosim et al. (2000). Martin-Eauclaire et al. (2006) obtained similar results using the anatoxin Amm8 from *A. mauretanicus* that has an 87% sequence similarity with toxin AaH2. Each ml of rabbit's anti-Amm8 serum neutralized 42 LD<sub>50</sub> of the AaH2 toxin. Srairi-Abid et al. (2008) demonstrated that immunization with anatoxins KAaH1 and KAaH2 from *A. australis* elicited the generation of antiserum that conferred protection against both the AaH2 toxin and its G50 toxic fraction. Anatoxins represent an interesting tool for the production of scorpion venom antiserum since they are not associated with toxicity in mammals.

#### 2.4. Immunization protocols using recombinant toxins

It is known that neurotoxins represent the primary toxic components of scorpion venoms and that neurotoxins are similar both in their primary sequences, tertiary structures, and pattern of disulfide bonds. Therefore, serum generated against one (or a few toxins) may generate cross-reactive antibodies capable of neutralizing other toxic components. Additionally, some toxins may represent a larger proportion of the venom (e.g., the *T. serrulatus*  $\beta$ -toxin Ts1 comprises 15% of the venom) (Cologna et al., 2009) and others may represent a very small percent in the crude venom (Alvarenga et al. 2012) limiting their use in the production of antivenom. An option to purifying toxins present at low concentrations in venom is the generation of recombinant toxins using *Escherichia coli* expression systems. These systems are very well characterized and shown to generate large amounts of the recombinant protein. The first scorpion recombinant toxins used in the immunization of animals were expressed as N- or C-terminal fusion proteins that increased protein solubility and facilitated their purification. Bouhaouala-Zahar et al. (1996) expressed the  $\alpha$ -toxin BotXIV from *Buthus occitanus tunetanus* as a fusion protein with 2 Z domains in tandem (the Z domain is the binding domain of *Staphylococcus aureus* Protein A). This recombinant toxin caused paralysis in insects but had no discernable effects on mammals. Furthermore, the rabbit's serum generated against this recombinant toxin neutralized 20 LD<sub>50</sub> per ml of serum against the G50 toxic fraction of scorpion venom. In addition, immunizations using the recombinant protein conferred protection against challenge with the G50 toxic fraction. Follow the same strategy Benkhadir et al. (2002) expressed the Bot-III and the mouse's antivenom neutralized 10 LD<sub>50</sub> per ml. Guatimosim et al. (2000) expressed the *T. serrulatus* TsNTxP anatoxin fused with the maltose binding protein (MBP) that was highly soluble and easily purified using affinity columns. The rabbit's antiserum generated following immunization with TsNTxP-MBP neutralized 20 LD<sub>50</sub> per ml of serum against crude *T. serrulatus* venom. Legros et al. (2001) expressed 3 *A. australis* toxins (AaH1, AaH2 and AaH3) fused with MBP that elicited the production of antibodies in rabbits that together neutralized 15 LD<sub>50</sub> per ml of serum against the G50 toxic fraction of *A. australis* Hektor venom. In addition vaccine protection in mice was observed. Garcia et al. (2003) expressed the antiscorpion *Centruroides noxius* Hoffmann Cn5 toxin but was unable to generate neutralizing rabbit's antibodies nor provide vaccine protection against the antimammalian toxin Cn2 native to the same species.

Bacterial expression systems can produce recombinant proteins in insoluble inclusion bodies. However, Mendes et al. (2008) showed that inclusion bodies were also immunogenic. Specifically, the antimammalian  $\beta$ -toxin Ts1 (the most abundant component of *T. serrulatus* venom) was expressed like inclusion bodies with 2 Ts1 copies in tandem and a small T7-Tag fusion. This recombinant form of Ts1 elicited the production of rabbit's antiserum that neutralized 15 LD<sub>50</sub> per ml of serum against crude *T. serrulatus* venom and neutralized the native Ts1. The serum also

conferred vaccine protection against crude venom in mice.

Recombinant proteins containing a 6x-His (6 histidine) tags have also used for the expression of recombinant toxins. The 6x-His tag has a high affinity for Ni<sup>2+</sup> that facilitates its purification using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The system can be used with a wide variety of buffers and reagents providing plasticity and good yields. García-Gómez et al. (2009) expressed the PG8 antimammalian toxin from the venom of *Parabuthus granulatus* as a His-tag that elicited the production of antibodies following immunization. The mouse's serum from recombinant Pg8 neutralized 8 LD<sub>50</sub> per ml of serum against native Pg8 and conferred vaccine protection against challenge with crude *P. granulatus* venom in mice.

Hernández-Salgado et al. (2009) expressed 3 recombinant isoforms of the *Centruroides suffusus* Ccs2 antimammalian toxin. Two isoforms were active: one was similar to native toxin and the other had a tail of histidines. The isoform with the an E15R mutation was inactive and the sera generated following immunization of animals using these 3 Ccs2 isoforms elicited the production of antibodies in rabbits capable of neutralizing 15 LD<sub>50</sub> per ml of serum against crude venom or against native Ccs2.

Most studies describing the use of recombinant toxins demonstrated that antiserum generated following immunization with recombinant toxins were protective against crude venom. However, there is still a need to produce different recombinant toxins from the same scorpion for the generation of antiserum that would provide more effective protection against the crude venom. One advantage of using recombinant toxins immunogens is that these proteins are not toxic unless they also possess a tertiary structure similar to that of the native toxin with a refolding treatment. Without toxicity, immunization with these proteins causes less damage to the host. Nevertheless, the biggest problem of using this technique is the inability of bacteria to form disulfide bonds correctly, resulting in the expression of a toxin devoid of its native tertiary structure. Without the correct tertiary structure, conformational epitopes are modified, thus some antibodies generated will not provide protection against native toxin or crude venom.

#### 2.5. Immunization protocols using synthetic epitopes

Another approach used in the generation of antivenom is immunization using synthetic peptides comprised of sequences similar to those present in scorpion toxins. These epitopes are initially identified using mapping techniques such as phage display and the SPOT method (Gazarian et al. 2000; Duarte et al., 2010). The phage display technique (Smith, 1985) utilizes a phage library that expresses different peptides on the surface of each capsid. Immunoreactive peptides are then sequenced to identify the peptide(s) of interest. The SPOT technique utilizes peptides synthesized from the target sequence (10–15 base pairs in length) that are bound to a cellulose membrane and then screened with toxin-specific antibodies. Positive reactions allow for the identification of peptides corresponding to immunogenic, linear epitopes. After identification, the most reactive epitopes are synthesized and used to immunize animals. Continuous epitopes comprise a linear portion of the primary toxin sequence and discontinuous epitopes are comprised of different portions of the primary sequence that are in close proximity in the tertiary structure. To increase their immunogenicity small peptides are often conjugated to a carrier protein like BSA (bovine serum albumin), OVA (ovalbumin), or KLH (keyhole limpet hemocyanin).

Bahraoui et al. (1986) produced the first antipeptide serum following immunization of rabbits with the *A. australis* Hektor AaH2 toxin residues 50–59 conjugated to albumin. This antiserum effectively neutralized the native toxin but was not tested against

crude venom or in vaccine protection experiments. Ait-Amara et al. (1993) evaluated antiserum production following immunization with the same peptide in mice, but neutralizing antiserum was not generated in this model. Calderon-Aranda et al. (1995) synthesized 7 peptides of 10–57 residues based on the primary sequence of the *C. noxius* Cn2 toxin. These peptides generated rabbit's antiserum of varying protective capacities. While the chimeric peptide of 57 amino acids elicited the production of neutralizing antibodies, no single peptide induced vaccine protection. Since the N-terminus of neurotoxins appears to be more immunogenic, peptides spanning this region were used by Devaux et al. (1997) that synthesized an 8mer peptide derived from the AaH2 toxin sequence. Mouse's serum produced against this peptide neutralized the native toxin and the G50 toxic fraction.

Alvarenga et al. (2002) used a mixture of 4 KLH-linked peptides spanning residues 1–15, 29–43, and 49–63 of the TsNTxP anatoxin and residues 50–64 of the *T. serrulatus* Ts3 toxin to immunize rabbits. The serum generated neutralized 13.5 LD<sub>50</sub> of the toxic fraction of the G50 toxic fraction per ml of serum. Inceoglu et al. (2006) immunized rabbits with a peptide spanning residues 1–18 of birtoxin, which is a sequence common to several toxins present in the venom of *Parabuthus transvaalicus*. The serum generated neutralized the crude venom (60 LD<sub>99</sub> per ml of serum) and showed cross-reactivity against other toxins. Calderon-Aranda et al. (1999) produced antiserum against the SP1 peptide from the *C. noxius* Cn2 toxin that was generated by linking the N- and C-terminal portions by a disulfide bridge. The rabbit's antiserum generated neutralized 39.5 LD<sub>50</sub> of Cn2 per ml of serum but did not confer vaccine protection. Duarte et al. (2010) searched for discontinuous epitopes by combinatorial analysis of 2 octapeptides corresponding to the N- and C-terminal portions of the of *T. serrulatus* TsNTxP anatoxin connected by two glycine residues using the SPOT method. The most reactive peptide was used as a vaccine in mice and conferred protection of 1.75 LD<sub>100</sub> of crude venom.

Studies using synthetic peptides showed that it is possible to produce neutralizing antiserum following immunization with defined epitopes. These peptides may require a carrier protein to induce sufficient production of neutralizing antibodies since antibody yields are typically low in the absence of a carrier.

Although some peptides elicited the production of neutralizing antitoxin antibodies, additional testing (formulations contain multiple peptides) will be needed to assess the ability of these peptides to elicit the production of cross-protective antibodies capable of neutralizing other toxins important to venom toxicity.

#### 2.6. Monoclonal antibody based scorpion antivenoms

Since the development of monoclonal antibodies by Kohler and Milstein (1975), numerous monoclonal antibodies (mAbs) have been developed for the treatment of disease and the development of immunodiagnostic kits. The first mAb antibody generated against a scorpion toxin was generated by El Ayeb and Rochat (1988) who produced 2 monoclonal antibodies specific for the *A. australis* AaH2 toxin. Both antibodies bound well to the toxin; however, only 1 clone exhibited neutralizing activity (Yahi et al. 1992). Despite the specificity of mAbs to their respective targets not every mAb has neutralizing capacity because the antibody binding site may be located in a region that does not block the action of the toxin (Bahraoui et al., 1988; Devaux et al., 1997; Clot-Faybesse et al., 1999; Mousli et al., 1999). Few monoclonal antibodies are capable of recognizing more than 1 antigen due to sequence similarity among scorpion venom toxins (across species or genus), however, this cross-reaction is ideal for scorpion venom neutralization (Zamudio et al. 1992; Héron et al. 1995; Calderon-Aranda et al. 1995; Alvarenga et al. 2005). Licea et al. (1996)

characterized a monoclonal antibody capable of neutralizing up to 43 LD<sub>50</sub> per mg of F(ab')<sub>2</sub> against *C. noxius* venom.

This technology presents an interesting way of producing anti-venom, but needs to be further developed so as to produce mAbs with higher neutralizing potential. Due to the specificity of these antibodies, sometimes only a few toxins present in venom are neutralized, leaving other toxins active. Therefore, a mix of mAbs will be required to obtain satisfactory venom neutralization. The search for new human mAbs seems to be the most efficient way of obtaining an effective antiserum since using mAbs prevents allergic reactions which are rare in the treatment of scorpionism compared to rates observed as a consequence of serotherapy used to treat bites/stings from other venomous animals. This fact is also connected to purification and fragmentation of antibodies, which increases the tolerance to serum therapy (Lo Vecchio et al., 1999; Da Silva et al., 2011). It is likely that the identification of new mAbs could lead to the development of an effective scorpion venom antiserum specific to the respective venom of species considered dangerous to humans. Other mAbs specific for scorpion toxins have been used to identify novel epitopes and toxins (Jia et al. 2000; Wu et al., 2001; Devaux et al., 2002; Hernández et al. 2002).

#### 2.7. Recombinant antibodies based scorpion antivenoms

The fusion of the 2 methodologies aimed at producing scorpion antivenom gave rise to recombinant antibodies. These types of antibodies have been previously used as probes, diagnostics, and even as therapeutic agents (Frenzel et al. 2013). Several heterologous expression systems can be used, resulting in a higher recombinant protein yield compared to the traditional generation of monoclonal antibodies in cell culture. In addition, antibodies generated using recombinant DNA may contain various modifications including the generation of chimeric antibodies constructed using heavy and light chains derived from different organisms. Recombinant antibodies can be derived from cells producing known monoclonal antibodies following the isolation of specific cDNA encoding only the antigen recognition domain (variable portion) that is subsequently cloned into the expression vector of interest.

The first recombinant antibody was developed by Mousli et al. (1999) and derived from the 4C1 monoclonal antibody that specifically recognized the *A. australis* AaH2 toxin. Only the antigen recognition domain was cloned into the *E. coli* expression system. Aubrey et al. (2003) expressed in *E. coli* a recombinant Fab (rFab) specific for the AaH1 toxin based on the 9C2 dimeric antibody. Selisko et al. (2004) constructed a chimeric antibody containing human constant and variable regions that comprised the antigen recognition site derived from the BCF2 monoclonal antibody that neutralized *C. noxius* venom. All of these recombinant antibodies showed the same characteristics as monoclonal antibodies from which they were derived. Aubrey et al. (2004) developed Fab' fragments specific for toxins AaH1 and AaH3; however, this recombinant fragment was less effective than the intact antibody.

Juárez-González et al. (2005) using the sequence of the monoclonal antibody BCF2, developed a mutated recombinant antibody that was able to neutralize the *C. noxius* crude venom. Juste et al. (2007) successfully constructed in tandem monoclonal antibodies capable of neutralizing both the AaH1 and AaH2 toxins. Di Tommaso et al. (2012) followed the same line of research and expressed the antibodies separately, achieving stability. In addition, these antibodies neutralized the venom between 2 and 3 LD<sub>50</sub> per mg of antibody. Another aspect of this methodology was the generation of humanized antibodies. The neutralizing capacity of these antibodies has been successfully described by several authors (Riño-Umbarila et al., 2005, 2011; Amaro et al., 2011; Pucca et al.,

2012; Quintero-Hernández et al., 2012).

The final breakthrough was the discovery of nanobodies that are antibodies (as the name suggests) of smaller size found in both sharks and camelids. Nanobodies (12–15 kDa) have a single VHH antigen-binding domain. These molecules are advantageous because their size allows them to bind epitopes unavailable to conventional antibodies. They are very stable, can be recombinantly expressed, and are able to neutralize toxin at levels equivalent to those of conventional equine antibodies. The Fab' domain from equine IgG is 3 times larger than VHH domain from nanobodies, so its pharmacokinetics is more dynamic in nanobodies. For these reasons nanobodies have been reported to be very effective tools in addition to their ability to neutralize scorpions toxins rapidly (Hmila et al., 2008; Abderrazek et al., 2009, 2011; Hmila et al., 2010; Ezzine et al., 2012; Hmila et al., 2012). The advantage of using recombinant antibodies in general is directly linked to production yield and the ability to express antigen recognition domains only.

### 3. Concluding notes

Since scorpion antivenom was first generated by Todd (1909), significant developments in all phases of serum production have taken place including the development of immunization protocols, immunoglobulin purification processing, development of antibody preparations, and quality control measures that protect the user. All of these advances have made the use of scorpion antivenom increasingly safe for use in humans and animals. From the numerous studies analyzed during the preparation of this review the theme “development of an effective (and less harmful) scorpion antivenom” was a concern among several authors. The study utilized different methodologies including the use of synthetic peptides, recombinant toxins, venom detoxification, and the production of monoclonal and recombinant antibodies. Due to the way data were presented between studies it was difficult to compare the protective potential of the respective antisera preparations generated, making it challenging to determine which methodology was most effective. It would be interesting to start a discussion on the standardization of results obtained using different methodologies as a means of directly comparing their efficacy.

Perhaps the key to producing the most effective antiserum is to develop an immunogen comprised of several targets, inducing the generation of antibodies with the capacity of neutralizing various neurotoxins thereby reducing the amount of antiserum needed for successful therapy. It is important to mention that techniques used for the immunization of horses and/or other animals, may present a variation of efficiency; thus some antivenoms have good neutralizing capacity and other smaller, despite being produced with similar antigens.

In this review, we present methodologies for the improvement of antigens, in order to obtain a more effective immunization for scorpion venoms as well as other techniques for the direct improvement of the serum, as the production of monoclonal and recombinant antibodies. However, there is still a gap between academic research and the producers of serum. It is remarkable that these novel methodologies have not been yet used in the generation of scorpion antivenoms at the commercial level. Finally, we understand that the problem of antivenoms is very complex. We describe several methodologies used by different research groups, mainly in the search for better antigens, but other issues such as antivenom stability, distribution, and the presence of trained professionals in endemic areas are ongoing concerns of toxicologists (Gutiérrez et al., 2009).

### 4. Research methodology

This review documents what has been reported to date in the literature regarding the pros and cons of antivenom use and production, as well as the potential future impacts associated with antivenom production.

The search for relevant articles was conducted using PubMed. All relevant articles written between 1909 and 2013 were examined. The search was performed using 3 key words in order to identify articles of interest. The first key word was always “scorpion” and the other 2 key words were organized in specific areas and sub areas.

The search pattern can be summarized as follows:

Scorpion +	Area (Detoxification) (Monoclonal) (Recombinant) (Peptide) (Anatoxin)	+	Sub Area (Antivenom) (Antiserum) (Immunization) (Serum)
------------	--	---	---

Ex: “Scorpion + Peptide + Antivenom”.

The search identified 153 relevant articles that were grouped into topics for review and discussion. Among the articles identified the most studied scorpion species were *Androctonus* sp., *Centruroides* sp., and *T. serrulatus*, but others species were included in this review. Approximately 2 articles were published per year during the time period selected.

The search results identified several methodologies used in antiserum production with emphasis on detoxification of the venom, the use of toxic venom fractions, monoclonal antibodies, recombinant toxins, synthetic peptides, and anatoxins.

### Acknowledgments

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil – CAPES (Edital Toxicologia 63/2010; and PNPd AUXPE 2262/2011), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Process number APQ-00202-13) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq).

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.007>.

### References

- Abbadi, M., Iruberry, J., 1970. An attempt at detoxification of scorpion venom (*Androctonus australis*). Arch. Inst. Pasteur Alger. 48, 131–138.
- Abderrazek, R.B., Hmila, I., Vincke, C., Benlasfar, Z., Pellis, M., Dabbek, H., Saerens, D., El Ayeb, M., Muijldermans, S., Bouhaouala-Zahar, B., 2009 Nov 11. Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. Biochem. J. 424 (2), 263–272.
- Abderrazek, R.B., Vincke, C., Hmila, I., Saerens, D., Abidi, N., El Ayeb, M., Muijldermans, S., Bouhaouala-Zahar, B., 2011 Sep. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahII10 nanobody with improved neutralization of AahII scorpion toxin. Protein Eng. Des. Sel. 24 (9), 727–735.
- Abib, L., Laraba-Djebbari, F., 2003 Dec. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis* hector venom. Can. J. Physiol. Pharmacol. 81 (12), 1118–1124.
- Ait-Amara, D., Chávez-Olórtegui, C., Romi, R., Mery, J., Brugidou, J., Albericio, F., Devaux, C., Granier, C., 1993. Antibodies cross-reactive with the scorpion-toxin II from *Androctonus australis* Hector elicited in mice by a synthetic peptide. Nat.

- Toxins 1 (4), 255–262.
- Al-Sadoun, M.K., Jarrar, B.M., 2003. Epidemiological study of scorpion stings in Saudi Arabia between 1993 and 1997. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 9, 54–64.
- Alvarenga, L.M., Diniz, C.R., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2002 Jan. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon* 40 (1), 89–95.
- Alvarenga, L.M., Machado de Ávila, R.A., Amim, P.R., Martins, M.S., Kalapothakis, E., De Lima, M.E., Santos, R.G., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2005 Nov. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 46 (6), 664–671.
- Alvarenga, E.R., Mendes, T.M., Magalhães, B.F., Siqueira, F.F., Dantas, A.E., Barroca, T.M., Horta, C.C., Kalapothakis, E., 2012. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open J. Genet.* 2, 210–220.
- Amaro, I., Riaño-Urbarila, L., Becerril, B., Possani, L.D., 2011 Sep 30. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. *Immunol. Lett.* 139 (1–2), 73–79.
- Arantes, E.C., Prado, W.A., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., 1989. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. *Toxicon* 27 (8), 907–916.
- Arantes, E.C., Riccioppo Neto, F., Sampaio, S.V., Vieira, C.A., Giglio, J.R., 1994. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na<sup>+</sup> channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1199 (1), 69–75.
- Attamo, H., Diawara, N.A., Garba, A., 2002 Aug. Epidemiology of scorpion envenomations in the pediatric service of the Agadez hospital center (Niger) in 1999. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 95 (3), 209–211.
- Aubrey, N., Devaux, C., Sizaet, P.Y., Rochat, H., Goyffon, M., Billiard, P., 2003 Mar. Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (3), 617–628.
- Aubrey, N., Muzard, J., Christophe Peter, J., Rochat, H., Goyffon, M., Devaux, C., Billiard, P., 2004 Mar 1. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin AahI, and functional evaluation versus other antibody fragments. *Toxicon* 43 (3), 233–241.
- Bahraoui, E.M., Granier, C., Van Rietschoten, J., Rochat, H., El Ayeb, M., 1986 May 1. Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *J. Immunol.* 136 (9), 3371–3377.
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J.M., Darbon, H., El Ayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., Rochat, H., 1988 Jul 1. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J. Immunol.* 141 (1), 214–220.
- Barhaning, J., Giglio, J.R., Léopold, P., Schmid, A., Sampaio, S.V., Lazdunski, M., 1982. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *Tityus gamma* toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 257 (21), 12553–12558.
- Beccaloni, J., 2009. Arachnids. Natural History Museum, London. ISBN 978-0-656-09220-7.
- Becerril, B., Vázquez, A., García, C., Corona, M., Bolívar, F., Possani, L.D., 1993 Jun 30. Cloning and characterization of cDNAs that code for Na<sup>+</sup>-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Gene* 128 (2), 165–171.
- Becerril, B., Corona, M., Coronas, F.L., Zamudio, F., Calderon-Aranda, E.S., Fletcher P.J.R., Martin, B.M., Possani, L.D., 1996 Feb 1. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem. J.* 313 (Pt 3), 753–760.
- Benkhadir, K., Mejr, T., Bel Haj Rhouma, R., El Ayeb, M., Karoui, H., 2002. In vivo and in vitro protection against lethal activity of *Buthus occitanus tunetanus* venom with a recombinant protein. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 79 (1–4), 19–26.
- Benkhadir, K., Kharrat, R., Cestèle, S., Mosbah, A., Rochat, H., El Ayeb, M., Karoui, H., 2004 Feb. Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides* 25 (2), 151–161.
- Bergeron, Z.L., Bingham, J.P., 2012 Nov 1. Scorpion toxins specific for potassium (K<sup>+</sup>) channels: a historical overview of peptide bioengineering. *Toxins (Basel)* 4 (11), 1082–1119.
- Bergman, N.J., 1997 May. Clinical description of *Parabuthus transvaalicus* scorpionism in Zimbabwe. *Toxicon* 35 (5), 759–771.
- Billen, B., Bosmans, F., Tytgat, J., 2008. Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14 (24), 2492–2502.
- Borchani, L., Sassi, A., Ben Yekhef, R., Safra, I., El Ayeb, M., 2011a Dec 1. Hemineurolysin, a potential immunogen for monospecific antivenom production against *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon* 58 (8), 681–688.
- Borchani, L., Sassi, A., Shahbazzadeh, D., Strub, J.M., Tounsi-Guetteti, H., Boubaker, M.S., Akbari, A., Van Dorsselaer, A., El Ayeb, M., 2011b Jul. Hemineurolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. *Toxicon* 58 (1), 130–139.
- Borchani, L., Sassi, A., Ben Gharsa, H., Safra, I., Shahbazzadeh, D., Ben Lassar, Z., El Ayeb, M., 2013 Apr 2. The pathological effects of Hemineurolysin, a dermonecrotic toxin from *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom are mediated through its lysophospholipase D activity. *Toxicon* 68C, 30–39.
- Bosmans, F., Tytgat, J., 2007 Feb. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon* 49 (2), 142–158.
- Bougis, P.E., Rochat, H., Smith, L.A., 1989 Nov 15. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *J. Biol. Chem.* 264 (32), 19259–19265.
- Bouhaouala-Zahar, B., Ducancel, F., Zenouaki, I., Ben Khalifa, R., Borchani, L., Pelhate, M., Boulain, J.C., El Ayeb, M., Ménez, A., Karoui, H., 1996 Jun 15. A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. *Eur. J. Biochem.* 238 (3), 653–660.
- Calderon-Aranda, E.S., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., 1995 Sep. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine* 13 (13), 1198–1206.
- Calderon-Aranda, E.S., Selisko, B., York, E.J., Gurrola, G.B., Stewart, J.M., Possani, L.D., 1999 Sep. Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* 264 (3), 746–755.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A., 1982 Mar 4. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296 (5852), 90–91.
- Cardoso, J.L., Fan, W.H.R., Araujo, A.A., Santalucia, M., Lopes, J.M., 1995. Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990–1993). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 28, 10.
- Carmo, A.O., Oliveira-Mendes, B.B., Horta, C.C., Magalhães, B.F., Dantas, A.E., Chaves, L.M., Chávez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2014 Nov. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon* 90, 45–55.
- Catterall, W.A., 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15–43.
- Celis, A., Gaxiola-Robles, R., Sevilla-Godínez, E., Orozco Valerio Mde, J., Armas, J., 2007 Jun. Trends in mortality from scorpion stings in Mexico, 1979–2003. *Rev. Panam. Salud Pública* 21 (6), 373–380. Spanish.
- Chávez-Olortegui, C., Amara, D.A., Rochat, H., Diniz, C., Granier, C., 1991 Dec. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine* 9 (12), 907–910.
- Chávez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., Ferreira, A.M., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., 1997 Feb. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35 (2), 213–221.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008 Aug. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107 (2), 71–79.
- Chippaux, J.P., Diouf, A., Stock, R.P., Parra, H.J., Massougbdji, A., 2011 Oct. Report of the 4th International Conference on envenomations by snakebites and scorpion stings in Africa, Dakar, April 25–29, 2011. *Toxicon* 58 (5), 426–429.
- Chowell, G., Hyman, J.M., Díaz-Dueñas, P., Hengartner, N.W., 2005 Dec. Predicting scorpion sting incidence in an endemic region using climatological variables. *Int. J. Environ. Health Res.* 15 (6), 425–435.
- Chugunov, A.O., Koromylova, A.D., Berkut, A.A., Peigneur, S., Tytgat, J., Polyansky, A.A., Pentkovsky, V.M., Vassilevski, A.A., Grishin, E.V., Efremov, R.G., 2013 Jun 28. Modular organization of  $\alpha$ -toxins from scorpion venom Mirrors domain structure of their targets – sodium channels. *J. Biol. Chem.* 288 (26), 19014–19027.
- Clot-Faybesse, O., Juin, M., Rochat, H., Devaux, C., 1999 Sep 24. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* hector scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett.* 458 (3), 313–318.
- Cologna, C.T., Marcussi, S., Giglio, J.R., Soames, A.M., Arantes, E.C., 2009. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein Pept. Lett.* 16 (8), 920–932.
- Costal-Oliveira, F., Duarte, C.G., Machado De Ávila, R.A., Melo, M.M., Bordon, K.C., Arantes, E.C., Paredes, N.C., Tintaya, B., Bonilla, C., Bonilla, R.E., Suarez, W.S., Yarleque, A., Fernandez, J.M., Kalapothakis, E., Chávez-Olortegui, C., 2012 Oct. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon* 60 (5), 934–942.
- Da Silva, H.A., Pathmeswaran, A., Ranasinha, C.D., Jayamanne, S., Samarakoon, S.B., Hitharage, A., Kalupahana, R., Ratatilaka, G.A., Uluwathage, W., Aronson, J.K., Armitage, J.M., Laloo, D.G., De Silva, H.J., 2011 May. Low-dose adrenaline, promethazine, and hydrocortisone in the prevention of acute adverse reactions to antivenom following snakebite: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 8 (5), e1000435.
- Das Gupta, S.C., Gomes, A., Gomes, A., Basu, A., Lahiri, S.C., 1989 Jun. Comparative detoxification and protection of scorpion (*Heterometrus bengalensis*) venom by toxoid antiserum. *Indian J. Exp. Biol.* 27 (6), 568–573.
- De Rezende, N.A., Dias, M.B., Campolina, D., Chávez-Olortegui, C., Diniz, C.R., Amaral, C.F., 1995 Mar. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52 (3), 277–280.
- De Roodt, A.R., García, S.I., Salomón, O.D., Segre, L., Dolab, J.A., Funes, R.F., De Titto, E.H., 2003 Jun. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon* 41 (8), 971–977.
- De Sousa, L., Bonoli, S., Quiroga, M., Parrilla, P., 1996 Mar–Apr. Scorpion sting epidemiology in Montes Municipality of the State of Sucre, Venezuela: geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38 (2), 147–152.
- Dehesa-Dávila, M., Ramírez, A.N., Zamudio, F.Z., Gurrola-Briones, G., Liévano, A., Darszon, A., Possani, L.D., 1996 Feb. Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 113 (2), 331–339.
- Delori, P., Van Rietschoten, J., Rochat, H., 1981. Scorpion venoms and neurotoxins: an immunological study. *Toxicon* 19 (3), 393–407.
- Dent, M.A., Possani, L.D., Ramírez, G.A., Fletcher Jr., P.L., 1980. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18 (3), 343–350.
- Devaux, C., Clot-Faybesse, O., Juin, M., Mabrouk, K., Sabatier, J.M., Rochat, H., 1997

- Aug 4. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis* hector scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Lett.* 412 (3), 456–460.
- Devaux, C., Clot-Faybessé, O., Pugnère, M., Mani, J.C., Rochat, H., Granier, C., 2002 Dec 20. A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high-affinity monoclonal antibodies and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *J. Immunol. Methods* 271 (1–2), 37–46.
- Di Tommaso, A., Juste, M.O., Martin-Eauclaire, M.F., Dimier-Poisson, I., Billiard, P., Aubrey, N., 2012 Apr 20. Diabody mixture providing full protection against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis* venom. *J. Biol. Chem.* 287 (17), 14149–14156.
- Duarte, C.G., Alvarenga, L.M., Dias-Lopes, C., Machado de Ávila, R.A., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2010 Feb 3. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine* 28 (5), 1168–1176.
- El Ayeb, M., Rochat, H., 1988 Jan–Apr. Production of monoclonal antibodies. Scorpion antitoxins: characterization and molecular mechanisms of neutralization. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 65 (1–2), 29–41.
- Espino-Solis, G.P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L.D., 2009 Mar 6. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J. Proteomics* 72 (2), 183–199.
- Ezine, A., M'hirsi, E.I., Adab, S., Bouhaouala-Zahar, B., Hmila, I., Baciou, L., Marzouki, M.N., 2012 Jan–Feb. Efficient expression of the anti-Aahl' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59 (1), 15–21.
- Fletcher, P.L.J.R., Fletcher, M.D., Weninger, K., Anderson, T.E., Martin, B.M., 2010 Mar 5. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Biol. Chem.* 285 (10), 7405–7416.
- Fonseca, S.G., Ferreira, A.M., Diniz, C.R., Chávez-Olortegui, C., 1997 Jul. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with scorpion toxins detoxified by liposomal entrapment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30 (7), 883–886.
- Freire-Maia, L., Campos, J.A., 1989. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: Ownby, C.L., Odell, G.V. (Eds.), *Natural Toxins*. Pergamon Press, Oxford, p. 139.
- Frenzel, A., Hust, M., Schirmann, T., 2013 Jul 29. Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* 4 (217).
- García, C., Calderón-Aranda, E.S., Anguiano, G.A., Becerril, B., Possani, L.D., 2003 Mar. 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* 41 (4), 417–427.
- García Y Pérez, G., Martín, M.F., Rochat, H., 1988. Preparation of a polyvalent antivenom against various Mexican scorpion *Centruroides* species. *Toxicon* 26 (11), 1102–1106.
- García-Gómez, B.I., Olamendi-Portugal, T.C., Paniagua, J., Van der Walt, J., Dyason, K., Possani, L.D., 2009 Jun. Heterologous expression of a gene that codes for Pg8, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice. *Toxicon* 53 (7–8), 770–778.
- Gazarian, T., Selisko, B., Héron, P., Gazarian, K., 2000 Aug–Sep. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Mol. Immunol.* 37 (12–13), 755–766.
- Guatimosim, S.C., Kalopothakis, E., Diniz, C.R., Chávez-Olortegui, C., 2000 Jan. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon* 38 (1), 113–121.
- Gutiérrez, J.M., Fan, H.W., Silvera, C.L., Angulo, Y., 2009 May. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon* 53 (6), 625–630.
- Gwee, M.C.E., Gopalakrishnakone, P., Cheah, L.S., Wong, P.T.H., Gong, J.P., Kini, R.M., 1996. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 15, 37–57.
- Heneine, I.F., Heneine, L.G., 1998 Mar. Stepwise iodination. A general procedure for detoxification of proteins suitable for vaccine development and antiserum production. *Biologicals* 26 (1), 25–32.
- Heneine, L.G., Cardoso, V.N., Daniel, J.P., Heneine, I.F., 1986. Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives. *Toxicon* 24 (5), 501–505.
- Héron, P., Gurrola-Briones, G., Del Rocio Sánchez, M., Saavedra, R., Possani, L.D., 1995 Jun. Monoclonal antibodies against noxiustoxin. *Hybridoma* 14 (3), 247–251.
- Hernández, R., Gazarian, T.G., Héron, P.S., Gazarian, K.G., 2002 Feb 1. Molecular localization and cross reactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. *Immunol. Lett.* 80 (2), 97–103.
- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F.I., Possani, L.D., Corzo, G., 2009 Aug 15. Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin Cn2 are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunol. Lett.* 125 (2), 93–99.
- Hmila, I., Abdallah, R.B.A., Saerens, D., Benlasfar, Z., Conrath, K., Ayeb, M.E., Muyldermans, S., Bouhaouala-Zahar, B., 2008 Aug. VHH, bivalent domains and chimeric heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aahl. *Mol. Immunol.* 45 (14), 3847–3856.
- Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Muyldermans, S., 2010 Sep. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* 24 (9), 3479–3489.
- Hmila, I., Cosyns, B., Tounsi, H., Roosens, B., Caveliers, V., Abderrazek, R.B., Boubaker, S., Muyldermans, S., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Lahoutte, T., 2012 Oct. Pre-clinical studies of toxin-specific nanobodies: evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15 (264(2)), 222–231.
- Horta, C.C., Magalhães Bde, F., Oliveira-Mendes, B.R., Do Carmo, A.O., Duarte, C.G., Felicioni, L.F., Machado de Ávila, R.A., Chávez-Olortegui, C., Kalopothakis, E., 2014 Feb 13. Immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2), e2693.
- Inceoglu, B., Lango, J., Wu, J., Hawkins, P., Southern, J., Hammock, B.D., 2001 Oct. Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). *Eur. J. Biochem.* 268 (20), 5407–5413.
- Inceoglu, B., Lango, J., Rabinovich, A., Whetstone, P., Hammock, B.D., 2006 Feb. The neutralizing effect of a polyclonal antibody raised against the N-terminal eighteen-aminoacid residues of birtoxin towards the whole venom of *Parabuthus transvaalicus*. *Toxicon* 47 (2), 144–149. Epub 2005 Dec 13.
- Ja, L.Y., Xie, H.F., Ji, Y.H., 2000 May. Characterization of four distinct monoclonal antibodies specific to BmK AS-1, a novel scorpion bioactive polypeptide. *Toxicon* 38 (5), 605–617.
- Jover, E., Couraud, F., Rochat, H., 1980 Aug 29. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (4), 1607–1614.
- Juárez-González, V.R., Riaño-Umbarila, L., Quintero-Hernández, V., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Ortiz, E., Possani, L.D., Becerril, B., 2005 Mar 11. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2, a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J. Mol. Biol.* 346 (5), 1287–1297.
- Juste, M., Martin-Eauclaire, M.F., Devaux, C., Billiard, P., Aubrey, N., 2007 Jan. Using a recombinant bispecific antibody to block Na<sup>+</sup>-channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2), 206–218.
- Kaabi, H., Kharrat, R., El Ayeb, M., 2001. Study of the protective capacity of scorpion venom *Buthus occitanus tunetanus* polymerised to glutaraldehyde in mice strains with different haplotypes. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 78 (1–4), 17–23.
- Kalopothakis, E., Chávez-Olortegui, C., 1997 Oct. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* 35 (10), 1523–1529.
- Kharrat, R., Zenouaki, I., Ben Lasfar, Z., Miled, K., El Ayeb, M., 1997 Jun. Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. *Toxicon* 35 (6), 915–930.
- Khattabi, A., Soulymani-Bencheikh, R., Achour, S., Salmi, L.R., Scorpion Consensus Expert Group, 2011 Jul. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105 (7), 364–369.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.
- Kopeyan, C., Martínez, G., Rochat, H., 1978 May 1. Amino acid sequence of neurotoxin V from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *FEBS Lett.* 89 (1), 54–58.
- Kopeyan, C., Martínez, G., Rochat, H., 1985. Primary structure of toxin IV of *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *FEBS Lett.* 181, 211–217.
- Lala, K., Narayanan, P., 1994 Mar. Purification, N-terminal sequence and structural characterization of a toxic protein from the Indian scorpion venom *Buthus tamulus*. *Toxicon* 32 (3), 325–338.
- Legros, C., Kaabi, H., El Ayeb, M., Céard, B., Vacher, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 2001 Dec 12. Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 20 (5–6), 934–942.
- Licea, A.F., Becerril, B., Possani, L.D., 1996 Aug. Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Toxicon* 34 (8), 843–847.
- Lila, B.A., Laraba-Djebbari, F., 2011 Nov 8. Enhanced immune sera and vaccine: safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine* 29 (48), 8951–8959.
- Lo Vecchio, F., Welch, S., Klemens, J., Curry, S.C., Thomas, R., 1999 Nov. Incidence of immediate and delayed hypersensitivity to *Centruroides* antivenom. *Ann. Emerg. Med.* 34 (5), 615–619.
- Lozano, R.M., Yee, B.C., Buchanan, B.B., 1994 Mar. Thioredoxin-linked reductive inactivation of venom neurotoxins. *Arch. Biochem. Biophys.* 309 (2), 356–362.
- Lucas, S., 2003. O Laboratório de Artrópodos do Instituto Butantan e os aracnídeos peçonhentos. *Hist. Cienc. Saúde-Manguinhos* 10 (3), 1025–1035.
- Machado de Ávila, R.A., Alvarenga, L.M., Tavares, C.A., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2004 Sep 1. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon* 44 (3), 233–241.
- Mahaba, H.M.A., 1997. Scorpion sting syndrome: epidemiology, clinical presentation and management of 2240 cases. *East. Mediterr. Health J.* 3, 82–89.
- Mansour, N., 2001. Delay and characteristics of scorpion bite management in the Sidi-Bouazid region. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 78 (1–4), 25–31.
- Maria, W.S., Velarde, D.T., Alvarenga, L.M., Nguyen, C., Villard, S., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., 2005 Aug. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon* 46 (2), 210–217.
- Martin, M.F., García Y Pérez, L.G., El Ayeb, M., Kopeyan, C., Béchis, G., Jover, E.,

- Rochat, H., 1987 Apr 5. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *J. Biol. Chem.* 262 (10), 4452–4459.
- Martin-Eauclaire, M.F., Céard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E., 1994. Biochemical, pharmacological and genomic characterization of Ts IV, an  $\alpha$ -toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* 342 (2), 181–184.
- Martin-Eauclaire, M.F., Alami, M., Giamarchi, A., Missimilli, V., Rosso, J.P., Bougis, P.E., 2006 Mar 15. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine* 24 (12), 1990–1996.
- Maurano, H.R., 1915. Do escorpionismo. Tese de doutoramento, Rio de Janeiro, pp. 1–267. Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.
- Mebis, D., 2002. *Venomous and Poisonous Animals*. Medpharm Scientific Publishers, CRC Press, Stuttgart.
- Mendes, T.M., Dias, F., Horta, C.C.R., Pena, I.F., Arantes, E.C., Kalapothakis, E., 2008 Dec 1. Effective *Tityus serrulatus* antivenom produced using the Ts1 component. *Toxicon* 52 (7), 787–793.
- Ministério da Saúde, 2001. Escorpionismo. In: Comed/Asplan/Fns (Ed.), Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, Escorpionismo, Brasília, pp. 39–47.
- Miranda, F., Kupeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., Lissitzky, S., 1970 Nov. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tuetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.* 16 (3), 514–523.
- Morgenstern, D., Rohde, B.H., King, G.F., Tal, T., Sher, D., Zlotkin, E., 2011 Apr. The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta jadaica*. *Toxicon* 57 (5), 695–703.
- Mouhat, S., Jouinou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2004 Mar 15. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378 (Pt 3), 717–726.
- Moušil, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., Billiard, P., 1999 Jan 15. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Lett.* 442 (2–3), 183–188.
- Nishikawa, A.K., Caricati, C.P., Lima, M.L., Dos Santos, M.C., Kipnis, T.L., Eickstedt, V.R., Knysak, I., Da Silva, M.H., Higashi, H.G., Da Silva, W.D., 1994 Aug. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon* 32 (8), 989–998.
- Njah, M., Ben Abdelaziz, A., Abdouli, M., Zaher, M., Garaoui, A., 2001 Jan–Feb. Health program and use of community health workers: the example of scorpion envenomation in Tunisia. *Sante* 11 (1), 57–62.
- Norton, R.S., McDonough, S.J., 2008. Peptides targeting voltage-gated calcium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14 (24), 2480–2491.
- Orkan, O., Carhan, A., 2008 Aug 1. The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Toxicon* 52 (2), 375–379.
- Padilla, A., Govezensky, T., Possani, L.D., Larraalde, C., 2003 Jun. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon* 41 (8), 959–965.
- Pedraza Escalona, M., Possani, L.D., 2013 Jan 1. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Front.Biosci. (Landmark Ed.)* 18, 572–587.
- Pessini, A.C., Takao, T.T., Cavalheiro, E.C., Vichnewski, W., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2001 Oct. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39 (10), 1495–1504.
- Pete, M.J., Conlon, J.M., Murphy, R.F., 1992 Dec. Isolation and primary structure of a potent toxin from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40 (6), 582–586.
- Possani, L.D., Fernández de Castro, J., Juliá, J.Z., 1981. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius Hoffmann*) venom. *Toxicon* 19 (2), 323–329.
- Possani, L.D., Martín, B.M., Svendsen, I., 1982. The primary structure of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Carlsb. Res. Commun.* 47, 285–289.
- Prendini, L., Wheeler, W.C., 2005. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics* 21, 446–494.
- Pucca, M.B., Zoccal, K.F., Roncolato, E.C., Bertolini, T.B., Campos, L.B., Cologna, C.T., Faccioli, L.H., Arantes, E.C., Barbosa, J.E., 2012 Apr–Jun. Serumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. *J. Immunotoxicol.* 9 (2), 173–183.
- Quintero-Hernández, V., Del Pozo-Yauner, L., Pedraza-Escalona, M., Juárez-González, V.R., Alcántara-Recillas, I., Possani, L.D., Becerril, B., 2012 Apr 30. Evaluation of three different formats of a neutralizing single chain human antibody against toxin Cn2: neutralization capacity versus thermodynamic stability. *Immunol. Lett.* 143 (2), 152–160.
- Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V.R., Olamendi-Portugal, T., Ortíz-León, M., Possani, L.D., Becerril, B., 2005 May. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272 (10), 2591–2601.
- Riaño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gorzo, G., Possani, L.D., Becerril, B., 2011 Feb 25. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286 (8), 6143–6151.
- Rochat, C., Rochat, H., Miranda, F., Lissitzky, S., 1967 Feb. Purification and some properties of the neurotoxins of *Androctonus australis Hector*. *Biochemistry* 6 (2), 578–585.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005 Dec 15. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 46 (8), 831–844.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2010 Dec 15. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56 (7), 1155–1161.
- Rosso, J.P., Rochat, H., 1985. Characterization of ten proteins from the venom of the Moroccan scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, six of which are toxic to the mouse. *Toxicon* 23 (1), 113–125.
- Sautière, P., Cestèle, S., Kopeyan, C., Martinage, A., Drobecq, H., Doljansky, Y., Gordon, D., 1998 Aug. New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity. *Toxicon* 36 (8), 1141–1154.
- Schenone, H., Fontecilla, J., 1998 Jan–Jun. Scorpion stings outbreaks in recently constructed urban dwellings inhabitants. *Bol. Chil. Parasitol.* 53 (1–2), 35–37.
- Selisko, B., Cosío, G., García, C., Becerril, B., Possani, D., Hojales, E., 2004 Jan. Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmanni*. *Toxicon* 43 (1), 43–51.
- Shah, K., Tom Blake, J., Huang, C., Fischer, P., Koo, G.C., 2003 Feb. Immunosuppressive effects of a Kv1.3 inhibitor. *Cell. Immunol.* 221 (2), 100–106.
- Sharma, M., Ethayathulla, A.S., Jabeen, T., Singh, N., Sarvanan, K., Yadav, S., Sharma, S., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2006 Jul. Crystal structure of a highly acidic neurotoxin from scorpion *Buthus tamulus* at 2.2Å resolution reveals novel structural features. *J. Struct. Biol.* 155 (1), 52–62.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315–1317.
- Srairi-Abid, N., Kaabi, H., Mlayah-Bellalouna, S., Mejri, T., Sampieri, F., El Ayeb, M., 2008 Mar 1. Immunological characterization of a non-toxic peptide conferring protection against the toxic fraction (AahG50) of the *Androctonus australis hector* venom. *Toxicon* 51 (3), 353–362.
- Theakston, R.D., Warrell, D.A., Griffiths, E., 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41 (5), 541–557 pr.
- Todd, C., 1909 Apr. An anti-serum for scorpion venom. *J. Hyg. (Lond.)* 9 (1), 69–85.
- Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodríguez de la Vega, R.C., Pedraza-Alva, G., Tajtly, R.B., Gaspar, R., Cardenas, L., Rosenstein, Y., Beeton, C., Possani, L.D., Panyi, G., 2012 Sep. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol. Pharmacol.* 82 (3), 372–382.
- Venancio, E.J., Portato, F.C., Kuniyoshi, A.K., Carvalho, D.C., Pidde-Queiroz, G., Tambougi, D.V., 2013 Jul. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon* 69, 180–190.
- Vilela, E., 1917. Soroterapia anti-escorpionica. *Brazil-médico* 31, 393.
- Volkova, T.M., Garsia, A.F., Telezhinskaia, I.N., Potapenko, N.A., Grishin, E.V., 1984 Jul. Amino acid sequence of 2 neurotoxins from the scorpion *Buthus eupeus* venom. *Bioorg. Khim* 10 (7), 979–982.
- World Health Organization (WHO), 2007. Rabies and Envenomings: a Neglected Public Health Issue: Report of a Consultative Meeting. World Health Organization, Geneva.
- Wu, Y., Ji, Y.H., Shi, Y.L., 2001 Aug. Sodium current in NG108-15 cell inhibited by scorpion toxin BmKAS-1 and restored by its specific monoclonal antibodies. *J. Nat. Toxins* 10 (3), 193–198.
- Yahi, N., Devaux, C., Mansuelle, P., Defendini, M.L., Granier, C., 1992 Jul. Monoclonal antibodies to toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*: further characterization of epitope specificities and neutralizing capacities. *Toxicon* 30 (7), 723–731.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martín, B.M., Gurrola-Briones, G., Héron, P., Possani, L.D., 1992 Feb 15. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Eur. J. Biochem.* 204 (1), 281–292.

## Artigos publicados como colaborador. (Primeira página)

Vaccine 28 (2010) 6125–6127



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

Short communication

## Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants

Francisco C.F. Lobato<sup>a,\*</sup>, Catarina G.R.D. Lima<sup>a</sup>, Ronnie A. Assis<sup>b</sup>, Prhiscylla S. Pires<sup>a</sup>, Rodrigo O.S. Silva<sup>a</sup>, Felipe M. Salvarani<sup>a</sup>, Anderson O. Carmo<sup>c</sup>, Christiane Contigli<sup>d</sup>, Evanguedes Kalapothakis<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Bacteriology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School of Federal University of Minas Gerais, Antônio Carlos Avenue, 6627, Belo Horizonte 30123-970, MG, Brazil

<sup>b</sup> Nacional Agricultural Laboratory of Minas Gerais, Departamento de Clostridioses, Rômulo Joviano Avenue, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Molecular Markers and Biotechnology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Antônio Carlos Avenue, 6627, Belo Horizonte, Brazil

<sup>d</sup> Technology Center Foundation of Minas Gerais, José Cândido da Silveira Avenue, 2000, Belo Horizonte, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 June 2010

Received in revised form 14 July 2010

Accepted 14 July 2010

Available online 29 July 2010

## Keywords:

Vaccine

Enterotoxemia

*Clostridium perfringens*

## ABSTRACT

Enterotoxemia, a disease that affects domestic ruminants, is caused mainly by the epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D. Its eradication is virtually impossible, control and prophylaxis are based on systematic vaccination of herds with epsilon toxoids that are efficient in inducing protective antibody production. The use of recombinant toxins is one of the most promising of these strategies. This work evaluates the potency of a *Cl. perfringens* type D epsilon toxoid expressed by *Escherichia coli* administered to goats, sheep, and cattle. The *etx* gene was cloned into the pET-11a plasmid of *E. coli* strain BL21 to produce the recombinant toxin. Rabbits ( $n=8$ ), goats, sheep, and cattle ( $n=5$  for each species) were immunized with 0.2 mg of the insoluble recombinant protein fraction to evaluate vaccine potency of the epsilon toxoid studied. Antibody titers were 40, 14.3, 26, and 13.1 IU/mL in the rabbit, goat, sheep, and cattle serum pools, respectively. The epsilon toxoid produced and tested in this work is adequate for immunization of ruminants against enterotoxemia.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Clostridium perfringens* is a widespread Gram-positive obligate anaerobic bacterium that is extremely pathogenic for men and animals. It is classified into five types (from A to E) based on production of one or more of the four main toxins. Epsilon exotoxin, produced by *Cl. perfringens* types B and D, is one of the most potent toxins of microbial origin that has thus far been discovered. It is usually lethal for ruminants, particularly sheep [1].

Since its eradication is virtually impossible, control and prophylaxis are based on systematic vaccination of herds with epsilon toxoids. About 150 million doses of vaccine containing this toxoid are produced every year in Brazil. This figure reflects the growing need to protect a large number of animals in livestock production systems against several diseases [2].

Although there is significant production of multivalent clostridial vaccines, there is to date no official control over the potency of all components of these products. The Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply systematically evaluates *Clostridium chauvoei* bacterins, botulinic toxoids types C and D, and – since 2009 – beta and epsilon toxoids from *Cl. perfringens*

types B, C, and D. Therefore, the quality of the other components in Brazil-manufactured clostridial vaccines is left for the producing laboratories to control [3].

Brazilian research papers on the quality of epsilon toxoids from *Cl. perfringens* report that most products tested did not efficiently induce protective levels of antibody titers. Plasmids which encode toxins could be a factor generating instability in the production of the protein *in vitro* [4].

Much research has been performed to discover strategies for producing continuously more potent toxoids. Culture medium composition has been varied [5,6], and strains that produce potent toxins have been selected, with some success [2]. Production of recombinant toxins, however, is a promising technique that allows for greater amounts of protein to be produced with satisfactory qualitative maintenance of the toxoid. The objective of this work is to evaluate the response of neutralizing antibodies against epsilon toxin in cattle, sheep, and goats inoculated with vaccines containing *Cl. perfringens* type D epsilon toxoid obtained by expressing the *etx* gene in *Escherichia coli*.

This research used the *etx* gene from *Cl. perfringens* type D strain U10, a known toxigenic strain, selected by dot-blot as previously described [2].

The recombinant epsilon toxoid was produced according to Sousa et al. [8]. Briefly, the *etx* gene, which encodes epsilon pro-

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 2103.

E-mail addresses: [flobato@vet.ufmg.br](mailto:flobato@vet.ufmg.br), [lobato.francisco@yahoo.com.br](mailto:lobato.francisco@yahoo.com.br) (F.C.F. Lobato).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity

Flávia F. Siqueira<sup>a</sup>, Marcelle O. Almeida<sup>a</sup>, Tatiana M. Barroca<sup>a</sup>, Carolina C.R. Horta<sup>a</sup>,  
Anderson O. Carmo<sup>a</sup>, Rodrigo O.S. Silva<sup>b</sup>, Prhiscylla S. Pires<sup>b</sup>,  
Francisco C.F. Lobato<sup>b</sup>, Evanguedes Kalapothakis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, Av. Antônio Carlos 6627, Campus da UFMG, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Bacterioses e Pesquisa, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, Campus da UFMG, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 December 2011

Received in revised form 9 April 2012

Accepted 10 April 2012

## Keywords:

*Plc* gene

Phospholipase C

Alpha-toxin

Genetic diversity

*Clostridium*

## ABSTRACT

*Clostridium perfringens* phospholipase C (Cp-PLC), also called alpha-toxin, is encoded by the *plc* gene and has been implicated in several diseases; however, only a few studies have described polymorphisms in this gene. The aim of this study was to analyze polymorphisms in the Cp-PLC nucleotide and amino acid sequences obtained from isolates from different regions and to compare them to *Clostridium* phospholipase C sequences deposited in the NCBI database. Environmental samples (sediment, poultry feed, sawdust) and stool samples (from poultry, bovine, swine, horse, caprine, bird, dog, rabbit, toucan) were collected from healthy and sick animals. A total of 73 isolates were analyzed with the majority of samples belonging to the toxin type A subtype and possessing the gene encoding for the beta-2 toxin. Comparison of *plc* gene sequences from respective isolates revealed a high genetic diversity in the nucleotide sequences of mature Cp-PLC. Sequence comparisons identified 30 amino acid substitutions and 34 isoforms including some isoforms with substitutions in amino acids critical to toxin function. Comparison of sequences obtained in this study to Cp-PLC sequences obtained from the NCBI database resulted in the identification of 11 common haplotypes and 22 new isoforms. Phylogenetic analysis of phospholipase C sequences obtained from other *Clostridium* species identified relationships previously described. This report describes a broad characterization of the genetic diversity in the *C. perfringens plc* gene resulting in the identification of various isoforms. A better understanding of sequences encoding phospholipase C isoforms may reveal changes associated with protein function and *C. perfringens* virulence.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Clostridium perfringens* is a ubiquitous Gram-positive anaerobe present in the intestinal flora of humans and animals as well as in soil and water, where its presence

might be indicative of fecal contamination (Florence et al., 2011). Among the eubacteria, the genus *Clostridium* produces more toxin than any other bacteria (Johnson, 1999). All strains of *C. perfringens* possess the gene encoding for phospholipase C (*plc*) (also referred to as alpha-toxin) in combination with differential expression of 3 major toxin-encoding genes (beta, epsilon and iota) used to classify strains as toxinotypes A–E (Petit et al., 1999). Phospholipase C has traditionally been considered a

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 2701; fax: +55 31 3409 2713.  
E-mail address: [ekalapo@icb.ufmg.br](mailto:ekalapo@icb.ufmg.br) (E. Kalapothakis).

## Evaluation of Brazilian Biotechnology Patent Activity from 1975 to 2010

Dias<sup>a,b</sup>, F. Delfim<sup>c</sup>, F. Drummond<sup>a,b</sup>, I. Carmo<sup>a</sup>, A.O. Barroca<sup>a</sup>, T.M. Horta<sup>a</sup>, C.C. and E. Kalapothakis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Consultoria, Biominas Brasil, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>c</sup>Departamento de Tecnologia, Takenet, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received: November 08, 2011 Revised: February 13, 2012 Accepted: February 13, 2012

**Abstract:** The analysis of patent activity is one methodology used for technological monitoring. In this paper, the activity of biotechnology-related patents in Brazil were analyzed through 30 International Patent Classification (IPC) codes published by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). We developed a program to analyse the dynamics of the major patent applicants, countries and IPC codes extracted from the Brazilian Patent Office (INPI) database. We also identified Brazilian patent applicants who tried to expand protection abroad *via* the Patent Cooperation Treaty (PCT). We had access to all patents published online at the INPI from 1975 to July 2010, including 9,791 biotechnology patent applications in Brazil, and 163 PCTs published online at World Intellectual Property Organization (WIPO) from 1997 to December 2010. To our knowledge, there are no other online reports of biotechnology patents previous to the years analyzed here. Most of the biotechnology patents filed in the INPI (10.9%) concerned measuring or testing processes involving nucleic acids. The second and third places belonged to patents involving agro-technologies (recombinant DNA technology for plant cells and new flowering plants, i.e. angiosperms, or processes for obtaining them, and reproduction of flowering plants by tissue culture techniques). The majority of patents (87.2%) were filed by nonresidents, with USA being responsible for 51.7% of all biotechnology patents deposited in Brazil. Analyzing the resident applicants per region, we found a hub in the southeast region of Brazil. Among the resident applicants for biotechnology patents filed in the INPI, 43.5% were from São Paulo, 18.3% were from Rio de Janeiro, and 9.7% were from Minas Gerais. Pfizer, Novartis, and Sanofi were the largest applicants in Brazil, with 339, 288, and 245 biotechnology patents filed, respectively. For residents, the largest applicant was the governmental institution FIOCRUZ (Oswaldo Cruz Foundation), which filed 69 biotechnology patents within the period analyzed. The first biotechnology patent applications *via* PCT were submitted by Brazilians in 1997, with 3 from UFMG (university), 2 from individuals, and 1 from EMBRAPA (research institute).

**Keywords:** Brazil, patent, biotechnology, PCT, INPI.

### 1. INTRODUCTION

In the field of biosciences, due to the potential for and speed of transformation of basic science into marketable products and processes, much emphasis has been placed on generating applicable technologies. According to the Biotechnology Industry Organization, 'biotechnology' refers to the use of cells and biomolecules to solve problems or process products [1]. Since the 1990s, several countries have invested in the development of the biotechnological sector. In 1998, Canada began a strategic renovation of biotechnology in the country [2]. In the 1990s, the German government launched the BioRegio competition, with the purpose of establishing a regional basis for research communities, companies, and funding [3]. In 2000, the Australian government published a document describing its position on biotechnology [4].

Brazil has the largest economy in Latin America and is a rapidly emerging economy along with Russia, India and

China and therefore there is a need for greater technological development. Following the global trend, since the 1990s, Brazil has sought to regularize patent activity in the country and to encourage technology transfer among universities, research centers, and companies. These initiatives have included the creation of knowledge networks, such as policies for Industrial Property and Innovation. In 2007, the government released its national policy of biotechnological development. Among other actions, this policy established the 'Comitê Nacional de Biotecnologia' (National Committee of Biotechnology), the purpose of which was to promote the development of the biotechnology sector in Brazil [5-7].

Given its development of a specific policy for the biotechnology sector, the Brazilian government clearly believes that biotechnological development represents an extremely promising opportunity to leverage national development based on knowledge and innovation. Indeed, this policy has contributed to the structuring of new economic and social systems in Brazil [7]. According to SCImago Journal & Country Rank, Brazilian biotechnology publications put the country in 13<sup>th</sup> place in the country rank [8]. The future of the biotechnology sector in Brazil is promising, because the country has an installed capacity for research, development, and innovation, and a large investment in biotechnological

\*Address correspondence to this author at the Bloco E3 Sala 179. Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha. Belo Horizonte - MG CEP 31270-901, Brazil; Tel: (+5531) 3409-2713; E-mail: ekalapo@icb.ufmg.br



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## ADP is a vasodilator component from *Lasiodora* sp. mygalomorph spider venom



C.C. Horta<sup>a</sup>, B.A. Rezende<sup>b,e</sup>, B.B.R. Oliveira-Mendes<sup>a</sup>, A.O. Carmo<sup>a</sup>,  
L.S.A. Capettini<sup>c</sup>, J.F. Silva<sup>b</sup>, M.T. Gomes<sup>d</sup>, C. Chávez-Olórtegui<sup>d</sup>, C.E.S. Bravo<sup>d,f</sup>,  
V.S. Lemos<sup>b</sup>, E. Kalapothakis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup>Instituto de Pós-Graduação, Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-110, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena, La Serena, Chile

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 March 2013

Received in revised form 5 June 2013

Accepted 11 June 2013

Available online 21 June 2013

#### Keywords:

*Lasiodora*  
Spider  
Venom  
Vasodilation  
Nitric oxide  
ADP

### ABSTRACT

Members of the spider genus *Lasiodora* are widely distributed in Brazil, where they are commonly known as caranguejeiras. *Lasiodora* spider venom is slightly harmful to humans. The bite of this spider causes local pain, edema and erythema. However, *Lasiodora* sp. spider venom may be a source of important pharmacological tools. Our research group has described previously that *Lasiodora* sp. venom produces bradycardia in the isolated rat heart. In the present work, we sought to evaluate the vascular effect of *Lasiodora* sp. venom and to isolate the vasoactive compounds from the venom. The results showed that *Lasiodora* spider venom induced a concentration-dependent vasodilation in rat aortic rings, which was dependent on the presence of a functional endothelium and abolished by the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME. Western blot experiments revealed that the venom also increased endothelial NOS function by increasing phosphorylation of the Ser<sup>1177</sup> residue. Assay-directed fractionation isolated a vasoactive fraction from *Lasiodora* sp. venom. Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) assays identified a mixture of two compounds: adenosine diphosphate (ADP, approximately 90%) and adenosine monophosphate (AMP, approximately 10%). The vasodilator effects of *Lasiodora* sp. whole venom, as well as ADP, were significantly inhibited by suramin, which is a purinergic P2-receptor antagonist. Therefore, the results of the present work indicate that ADP is a main vasodilator component of *Lasiodora* sp. spider venom.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Spider venoms are a complex mixture of substances, combinatorial libraries of molecules, which act on various physiological targets. These bioactive compounds are important tools with applications in basic research, as well as in medicine, as potential drugs for the treatment of pain,

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34092701; fax: +55 31 34092713.  
E-mail addresses: [ekalapo@icb.ufmg.br](mailto:ekalapo@icb.ufmg.br), [kalapothakis@gmail.com](mailto:kalapothakis@gmail.com) (E. Kalapothakis).

# Lysophosphatidic Acid Mediates the Release of Cytokines and Chemokines by Human Fibroblasts Treated with *Loxosceles* Spider Venom

Journal of Investigative Dermatology (2013) 133, 1682–1685; doi:10.1038/jid.2013.40; published online 28 February 2013

## TO THE EDITOR

*Loxosceles* spiders are a genus of arachnids, whose bites cause necrotizing skin lesions. They are distributed worldwide in temperate and tropical regions. In Brazil, approximately 10,000 cases of *Loxosceles* spider bites are reported

annually. *L. intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta* are prevalent in most of the southern states of Brazil, whereas *L. similis* has been described mainly in the state of Minas Gerais. *L. reclusa* and *L. deserta* cause the majority of accidents in North America. The

venoms of these species all have similar biochemical and pharmacological profiles (Barbaro *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2005; Chatzaki *et al.*, 2012). The envenomation, described as loxoscelism, is characterized by pain, local edema, and erythema, followed by dermonecrosis that require weeks to heal. The genesis of loxoscelism is attributed to a family of sphingomyelinase D enzymes, also known as

Abbreviations: LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine; LsV, *L. similis* venom; PLD, phospholipase D; recLiD1, recombinant *L. intermedia* dermonecrotic protein 1

Accepted article preview online 25 January 2013

1682 Journal of Investigative Dermatology (2013), Volume 133

were then incubated in Apoptosis/Necrosis Detection Kit buffer containing 1% v/v 7-AAD and Annexin V-Cy3 (Enzo LifeSciences, Farmingdale, NY), and subjected to flow cytometry.

Treatment with LsV or recLiD1 caused HFF-1 cell death after 48 hours, primarily due to apoptosis, which was not inhibited by Ki16425 (Figure 2a). The lack of inhibition was expected, as treatment with LPA did not cause cell death. Control LPC did not injure cells either (data not shown). As LPA can act as a cell survival or apoptotic factor, dependent upon the cell type (Ye *et al.*, 2002), we performed the same procedures using human umbilical vein endothelial cells, which yielded similar results (Figure 2b).

Thus, we did not find that LPA participates in apoptosis induced by LsV or recLiD1 in fibroblast and endothelial cells *in vitro*. These cells are known sites of *Loxosceles* venom interaction. Our results support the idea that PLD initiates the effects of *Loxosceles* venom through stimulation of acute inflammatory responses.

In conclusion, LPA receptors are involved in the release of proinflammatory cytokines/chemokines provoked by LsV and recLiD1. The present work contributes to the open discussion regarding the participation of LPA in the pathophysiology of cutaneous loxoscelism and paves the way for investigation of new therapeutic strategies.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq, CAPES, and FAPEMIG. We thank IEF/MG for the permission for spider collection. This study was developed in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

**Carolina C.R. Horta<sup>1</sup>,  
Bárbara B.R. Oliveira-Mendes<sup>1</sup>,  
Anderson O. do Carmo<sup>1</sup>,  
Flávia F. Siqueira<sup>1</sup>, Tatiana M. Barroca<sup>1</sup>,  
Samyra M. dos Santos Nassif Lacerda<sup>2</sup>,  
Paulo H. de Almeida Campos Jr<sup>2</sup>,  
Luiz R. de França<sup>2</sup>, Rodrigo L. Ferreira<sup>3</sup>  
and Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil and

<sup>3</sup>Setor de Zoologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil  
E-mail: ekalapo@icb.ufmg.br

## REFERENCES

- Barbaro KC, Knysak I, Martins R *et al.* (2005) Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45:489–99
- Barbaro KC, Lira MS, Araújo CA *et al.* (2010) Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* 56:972–9
- Chaim OM, da Silveira RB, Trevisan-Silva D *et al.* (2011) Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1811:84–96
- Chatzaki M, Horta CC, Almeida MO *et al.* (2012) Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon* 60:21–30
- Dragulev B, Bao Y, Ramos-Cerrillo B *et al.* (2007) Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. *J Invest Dermatol* 127:1264–6
- Fang X, Yu S, Bast RC *et al.* (2004) Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 279:9653–61
- Felicori L, Araujo SC, de Avila RA *et al.* (2006) Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon* 48:509–19
- Kalapothakis E, Araujo SC, de Castro CS *et al.* (2002) Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 40:1691–9
- Kalapothakis E, Chatzaki M, Gonçalves-Dornelas H *et al.* (2007) The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon* 50:938–46
- Lee S, Lynch KR (2005) Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J* 391:317–23
- Silvestre FG, de Castro CS, de Moura JF *et al.* (2005) Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* 46:927–36
- Van Meeteren LA, Frederiks F, Giepmans BN *et al.* (2004) Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 279:10833–6
- Van Meeteren LA, Stortelers C, Moolenaar WH (2007) Upregulation of cytokine expression in fibroblasts exposed to *Loxosceles* sphingomyelinase D: what is the trigger? *J Invest Dermatol* 127:1266–7
- Ye X, Ishii I, Kingsbury MA *et al.* (2002) Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta* 1585:108–13
- Zhang Q, Peyruchaud O, French KJ *et al.* (1999) Sphingosine 1-phosphate stimulates fibronectin matrix assembly through a Rho-dependent signal pathway. *Blood* 93:2984–90

## MITOGENOME ANNOUNCEMENT

Complete mitochondrial genome sequence of *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Bryconidae)Flávia de Faria Siqueira<sup>1,2</sup>, Anderson Oliveira do Carmo<sup>1</sup>, Juliana da Silva Martins Pimentel<sup>1</sup>, and Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil and<sup>2</sup>Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Betim, Betim, Brasil

## Abstract

We report the whole mitochondrial genome of the *Brycon orbignyanus*, commonly known as the piracanjuba. The mitogenome was determined to be a circular, 16,800 bp DNA molecule, containing 13 protein-coding genes (PCGs), 2 rRNA genes, 22 tRNA genes and one 1160 bp noncoding control region. Twelve of the PCGs were located on the heavy strand, and one PCG (*Nd6*) was located on the light strand. The most common start codon was ATG; however, the *Cox1* gene displayed the GTG start codon. Seven PCGs had incomplete stop codons: specifically, *Cox2*, *Cox3*, *Nd3*, *Nd4*, and *Cytb* contained the T– codon, and *Nd2* and *Atp6* contained the TA– codon. The *Cox1* gene contained the AGG stop codon.

## Keywords

Fish, mitochondrion, mtDNA, next generation sequencing

## History

Received 22 September 2014

Accepted 26 September 2014

Published online 20 October 2014

*Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), commonly known as the piracanjuba, is a freshwater fish found in the Uruguay and Paraná-Paraguay basins. The species faces a high risk of extinction in some rivers, primarily due to human influence on the natural environment (e.g. dam construction). Piracanjuba is frequently harvested for human consumption, and its aggressive behavior makes it a popular target of sport fishing (Ganeco et al., 2009; Lopera-Barrero, 2009; Nakatani et al., 2011; Vaz, et al., 2000).

This study utilized a *B. orbignyanus* individual caught in the Grande River (20°01'53.8" S, 48°13'27.5" W). DNA was extracted from muscle tissue. A genomic library was constructed and sequenced using a paired-end 250-bp strategy on a MiSeq system (Illumina, San Diego, CA). *De novo* assembly was performed using Mira 4.0 (Chevreux et al., 1999). A unique, circular, 16,800 bp contig with 1361× coverage proved to be the complete mitochondrial DNA of *B. orbignyanus* (GenBank KM245044). The mitogenome was annotated with Mitofish (Iwasaki et al., 2013). Annotation revealed 13 protein-coding genes (PCGs), 2 rRNA genes, 22 tRNA genes and a noncoding Control Region (D-loop; Table 1). All PCGs, with the exception of *Nd6*, were encoded on the heavy strand of the mtDNA. The gene order and coding-strand data were consistent with those of all other currently published fish mitogenomes.

Twelve of the PCGs used ATG as the start codon. In contrast, the *Cox1* gene utilized the unusual GTG start codon. Five PCGs contained the complete stop codon TAA, and *Cox1* contained the AGG stop codon. The other seven PCGs contained incomplete stop codons (*Cox2*, *Cox3*, *Nd3*, *Nd4*, and *Cytb* contained T–; *Nd2* and *Atp6* contained TA–), which were completed during

Table 1. Annotation of mtDNA of *Brycon orbignyanus*.

Gene	Position		Size (bp)	Codon			Strand <sup>a</sup>
	From (bp)	To (bp)		Amino acid	Start codon	Stop codon	
tRNA <sup>Phe</sup>	1	68	68				H
12S rRNA	69	1020	952				H
tRNA <sup>Val</sup>	1021	1092	72				H
16S rRNA	1093	2767	1675				H
tRNA <sup>Leu2</sup>	2768	2842	75				H
<i>Nd1</i>	2843	3820	978	325	ATG	TAA	H
tRNA <sup>Ile</sup>	3829	3900	72				H
tRNA <sup>Gln</sup>	3899	3969	71				L
tRNA <sup>Met</sup>	3969	4038	70				H
<i>Nd2</i>	4039	5084	1046	348	ATG	TA–	H
tRNA <sup>Trp</sup>	5085	5155	71				H
tRNA <sup>Ala</sup>	5157	5225	69				L
tRNA <sup>Asn</sup>	5227	5299	73				L
tRNA <sup>Cys</sup>	5332	5397	66				L
tRNA <sup>Tyr</sup>	5403	5473	71				L
<i>Cox1</i>	5475	7031	1557	518	GTG	AGG	H
tRNA <sup>Ser2</sup>	7023	7093	71				L
tRNA <sup>Asp</sup>	7095	7167	73				H
<i>Cox2</i>	7181	7871	691	230	ATG	T–	H
tRNA <sup>Lys</sup>	7872	7947	76				H
<i>Atp8</i>	7949	8113	165	54	ATG	TAA	H
<i>Atp6</i>	8104	8786	683	227	ATG	TA–	H
<i>Cox3</i>	8787	9570	784	261	ATG	T–	H
tRNA <sup>Gly</sup>	9571	9642	72				H
<i>Nd3</i>	9643	9988	346	115	ATG	T–	H
tRNA <sup>Arg</sup>	9989	10,058	70				H

(continued)

Correspondence: Evanguedes Kalapothakis, Departamento de Biologia Geral; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. Tel: +55-31-3409-2701. Fax: +55-31-3409-2713. E-mail: kalapothakis@gmail.com

## MITOGENOME ANNOUNCEMENT

Complete mitochondrial genome of *Salminus brasiliensis*  
(Characiformes, Characidae)Pedro Ferreira Pinto Brandão-Dias<sup>1</sup>, Anderson Oliveira do Carmo<sup>1</sup>, Ana Paula Vimieiro Martins<sup>1</sup>,  
Ricardo José Gonzaga Pimenta<sup>1</sup>, Carlos Bernardo Mascarenhas Alves<sup>2</sup>, and Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, Pampulha, Belo Horizonte – MG, Brasil and <sup>2</sup>Nuvelhas-Projeto Manuelzão, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, Belo Horizonte – MG, Brasil

## Abstract

We report the complete mitochondrial genome of the fish *Salminus brasiliensis*, popularly known as dourado. It is a circular, 17,721 bp long DNA molecule, containing 13 protein-coding genes, 2 rRNA genes, 22 tRNA genes and a non-coding Control Region of 2128 bp, a relatively large molecule when compared to other closely related fishes. All protein-coding genes are on the heavy strand, except for *Cox1* gene which has a GTG start codon. Seven protein-coding genes have incomplete stop codons (*Nd2*, *Cox2*, *Atp6*, *Nd4*, and *Cytb* have T–, and *Cox3* and *Nd3* have TA–). TAG is the stop codon for *Nd6* and AGG is the stop codon for *Cox1*.

## Keywords

Dourado, fish, mtDNA, mitochondrion, next-generation sequencing

## History

Received 6 August 2014  
Accepted 23 August 2014  
Published online 10 September 2014

*Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), popularly known as dourado, is one of the largest fishes in the order Characiformes, with adults weighing more than 20 kg. It lives mainly in the Paraná-Paraguay and Uruguay rivers basins in Brazil, Argentina, Uruguay, and Paraguay, but it also occurs in other places, such as Lagoa dos Patos, Brazil (Rueda et al., 2011). *Salminus brasiliensis* is an important predatory piscivore that migrates upstream in the rainy season to reproduce (Esteves & Lôbo, 2001; Filho & Schubart, 1955; Lima & Britski, 2007). During migration, some populations are affected by dam constructions (Agostinho et al., 2003). Dourado is also prized by both commercial and amateur fisherman due to its flesh flavor and its resistance when caught (Lima & Britski, 2007).

A *S. brasiliensis* was caught in the Grande River (20°01'53.8' S, 48°13'27.5' W) and DNA was extracted from its muscular tissue according to Sambrook & Russell (2001). A genomic library was built using Nextera Kit (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol, and the library was then sequenced using MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA) with a 500 cycles paired-end strategy. We performed a *de novo*

assembly using MIRA assembly 4.0 (Chevreux et al., 1999), and a unique 17,721 bp contig with 148× coverage was extracted (GenBank accession number KM245047; Table 1). It had overlapping edges, and the highest BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) hits for this contig in Nucleotide Database of NCBI were to other complete Characiformes mtDNAs, confirming it as a mitochondrial genome sequence. We used Mitoannotator feature from Mitofish (Iwasaki et al., 2013) to annotate it. The molecule contains 13 protein-coding genes (PCGs), 2 rRNA genes, 22 tRNA genes, and a major non-coding Control Region. All PCGs, except for *Nd6*, are coded on the heavy strand. The gene order and coding strand were consistent with the order Characiformes. AT proportion was 55.7%.

All of the PCGs had ATG as the start codon, except for *Cox1*, which had an unusual GTG start codon. Of the 13 PCG's, only five had a complete TAA stop codon. TAG was the stop codon in *Nd6*, AGG was the stop codon in *Cox1*, and seven genes had incomplete stop codons (*Nd2*, *Cox2*, *Atp6*, *Nd4* and *Cytb* have T–, and *Cox3* and *Nd3* have TA–). Of the 22 tRNAs, eight were coded on the light strand and 14 were coded on the heavy strand. A tRNA inference analysis using MITOS (Bernt et al., 2013) revealed that 21 out of 22 tRNAs fold into the typical cloverleaf structure. The exception, tRNA<sup>Ser</sup>(GCT), may lack the D-arm. The Control Region was between tRNA<sup>Pro</sup> and tRNA<sup>Phe</sup>, and was 2128 bp long. Of the 18 complete Control Regions published for the order, the average length was 1020 bp. The longest currently known is from *Lebiasina astrigata* (Nakatani et al., 2011) with 1222 bp long. The enlarged D-loop in *S. brasiliensis* was due to an insertion of 1019 bp, which has no significant BLAST hits in the nr database of NCBI.

Correspondence: Evanguedes Kalapothakis, Instituto de Ciências Biológicas, Bloco E3, sala 179. Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte – MG, 31270-901 – Brasil. Tel: +55 3134092701. Fax: +55 3134092713. E-mail: kalapothakis@gmail.com

## MITOGENOME ANNOUNCEMENT

Complete mitochondrial genome sequence of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)Juliana da Silva Martins Pimentel<sup>1</sup>, Anderson Oliveira do Carmo<sup>1</sup>, Danielle de Cássia Lima Maciel<sup>1</sup>, Flávia de Faria Siqueira<sup>1,2</sup>, and Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil and<sup>2</sup>Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Betim, Betim, Brazil

## Abstract

The migratory species *Piaractus Mesopotamicus*, popularly known as the pacu, was determined to have a complete mitochondrial genome of 16,722 bp with 45% GC content. The genome contained 13 protein-coding genes (PCGs), 2 rRNA genes, 22 tRNA genes, and a 1048 bp Control Region (D-loop). Almost all the PCGs used the standard ATG start codon, except for *Cox1* that used a GTG start codon. Five of the 13 PCGs had a TAA stop codon, two had the incomplete stop codon TA- (*Atp6* and *Cox3*), and five had the incomplete stop codon T-- (*Nd2*, *Cox2*, *Nd3*, *Nd4*, and *Cytb*). AGG was the stop codon of *Cox1*.

## Keywords

Complete mitochondrial DNA, fish, next-generation sequencing

## History

Received 22 September 2014

Accepted 26 September 2014

Published online 16 October 2014

*Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), commonly known as the pacu-caranha or pacu, is an important fish species that is widely distributed in the Paraná-Paraguay basin in Brazil (Fowler, 1950; Resende, 2003). A member of the Serrasalminae family, the pacu is commercially important in professional and sport fisheries (Severi et al., 1999), and it displays a high potential for fish farming (Calcagnoto, 1998; Castagnolli & Zuim, 1985; Jomori et al., 2003; Resende, 2003). The pacu is a migratory species of the lotic and semilotic environments (Agostinho et al., 2004). As with other characins, the pacu is one of the first fish to initiate upstream spawning migration. Pacu grow to approximately 60 cm in length, with a robust oval body, dark gray back, and yellow belly (Britski et al., 2007). The pacu is characterized by strong molariform dentition that is capable of breaking hard fruit and seeds (Resende, 2003).

Previous population genetic studies of pacu have employed mitochondrial molecular markers (Calcagnoto, 1998). The vertebrate mitochondrial genome exhibits highly conserved gene content (Bilington & Hebert, 1991), and the genome is structured as a small, circular, covalently closed DNA molecule, ranging from 15 to 20 kb in size (Boore, 1999).

Mitochondrial DNA was extracted from muscle tissue collected from *P. mesopotamicus* obtained from the Grande River, Minas Gerais, Brazil (20°01'53.8" S, 48°13'27.5" W). A genomic library was constructed and sequenced via MiSeq (Illumina, San Diego, CA) technology using a paired-end 250-bp strategy. The complete mitogenome sequence measured 16,722 bp (GenBank accession number KM245046) with 597× coverage.

The mitogenome displayed 45% GC content and an overall base distribution of 30% A, 16% G, 25% T and 28% C. Genome annotation was performed with MitoAnnotator from the MitoFish webserver (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/annotation/input.html>; Iwasaki et al., 2013).

The *P. mesopotamicus* mitogenome contained 2 rRNA, 22 tRNA and 13 protein-coding genes (PCGs). This makeup is typical of vertebrate mitogenomes. The *Cox1* gene exhibited the GTG start codon, whereas all the other PCGs displayed the usual ATG start codon. Stop codon sequences identified in the mitogenome included TAA, TA- and T--. Incomplete codons (T-- and TA-) were completed during posttranscriptional polyadenylation (Ojala et al., 1981). Five of the 13 PCGs (*Nd1*, *Atp8*, *Nd4L*, *Nd5* and *Nd6*) contained the TAA stop codon.

The 1048 bp control region (D-loop) was located between the tRNA<sup>Pro</sup> and tRNA<sup>Phe</sup> loci (Table 1). Eight of the 22 tRNAs (tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Ser2</sup>, tRNA<sup>Pro</sup> and tRNA<sup>Asn</sup>) and one PCG (*Nd6*) were encoded on the light strand; the other genes were encoded on the heavy strand (Table 1). All tRNAs were between 68 and 75 bp in length and folded into a typical secondary structure. Some genes presented overlapping coding sequences (tRNA<sup>Gln</sup> and rRNA<sup>Met</sup>; *Cox1* and tRNA<sup>Ser</sup>; *Atp8* and *Atp6*; *Nd4L* and *Nd4*; *Nd5* and *Nd6*; tRNA<sup>Thr</sup> and tRNA<sup>Pro</sup>), most of which overlapped by a single base.

Our study is the first complete annotation of the pacu mitogenome. These findings will contribute to future studies utilizing mitogenomic molecular markers for pacu.

Correspondence: Evanguedes Kalapothakis, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Bloco E3, sala 179. Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. Tel: +55-31-3409-2701. Fax: +55-31-3409-2713. E-mail: kalapothakis@gmail.com

# Molecular, Immunological, and Biological Characterization of *Tityus serrulatus* Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation

Carolina Campolina Rebello Horta<sup>1,2,3</sup>, Bárbara de Freitas Magalhães<sup>1,3</sup>, Bárbara Bruna Ribeiro Oliveira-Mendes<sup>1</sup>, Anderson Oliveira do Carmo<sup>1</sup>, Clara Guerra Duarte<sup>3</sup>, Liza Figueiredo Felicori<sup>3</sup>, Ricardo Andrez Machado-de-Ávila<sup>3</sup>, Carlos Chávez-Olórtegui<sup>3</sup>, Evanguedes Kalapothakis<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## Abstract

**Background:** Scorpionism is a public health problem in Brazil, and *Tityus serrulatus* (Ts) is primarily responsible for severe accidents. The main toxic components of Ts venom are low-molecular-weight neurotoxins; however, the venom also contains poorly characterized high-molecular-weight enzymes. Hyaluronidase is one such enzyme that has been poorly characterized.

**Methods and principal findings:** We examined clones from a cDNA library of the Ts venom gland and described two novel isoforms of hyaluronidase, TsHyal-1 and TsHyal-2. The isoforms are 83% identical, and alignment of their predicted amino acid sequences with other hyaluronidases showed conserved residues between evolutionarily distant organisms. We performed gel filtration followed by reversed-phase chromatography to purify native hyaluronidase from Ts venom. Purified native Ts hyaluronidase was used to produce anti-hyaluronidase serum in rabbits. As little as 0.94  $\mu$ l of anti-hyaluronidase serum neutralized 1 LD<sub>50</sub> (13.2  $\mu$ g) of Ts venom hyaluronidase activity *in vitro*. *In vivo* neutralization assays showed that 121.6  $\mu$ l of anti-hyaluronidase serum inhibited mouse death 100%, whereas 60.8  $\mu$ l and 15.2  $\mu$ l of serum delayed mouse death. Inhibition of death was also achieved by using the hyaluronidase pharmacological inhibitor aristolochic acid. Addition of native Ts hyaluronidase (0.418  $\mu$ g) to pre-neutralized Ts venom (13.2  $\mu$ g venom+0.94  $\mu$ l anti-hyaluronidase serum) reversed mouse survival. We used the SPOT method to map TsHyal-1 and TsHyal-2 epitopes. More peptides were recognized by anti-hyaluronidase serum in TsHyal-1 than in TsHyal-2. Epitopes common to both isoforms included active site residues.

**Conclusions:** Hyaluronidase inhibition and immunoneutralization reduced the toxic effects of Ts venom. Our results have implications in scorpionism therapy and challenge the notion that only neurotoxins are important to the envenoming process.

**Citation:** Horta CCR, Magalhães Bdf, Oliveira-Mendes BBR, Carmo AO, Duarte CG, et al. (2014) Molecular, Immunological, and Biological Characterization of *Tityus serrulatus* Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. PLoS Negl Trop Dis 8(2): e2693. doi:10.1371/journal.pntd.0002693

**Editor:** Jean-Philippe Chippaux, Institut de Recherche pour le Développement, Benin

**Received:** September 6, 2013; **Accepted:** December 28, 2013; **Published:** February 13, 2014

**Copyright:** © 2014 Horta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; <http://www.cnpq.br>) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Edital Toxinologia 63/2010; <http://www.capes.gov.br>), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; <http://www.fapemig.br/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [ekalapo@icb.ufmg.br](mailto:ekalapo@icb.ufmg.br)

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Accidents with scorpion stings have been a serious public health problem in Brazil for many decades. In 2007, the World Health Organization (WHO) officially established scorpion sting envenoming as a neglected public health issue in many parts of the world, especially developing countries [1]. In 2010, the Brazilian Academy of Sciences (ABC) recognized the accidents caused by venomous animals as neglected tropical diseases [2].

In Brazil, scorpion accidents have the highest incidence when compared to those caused by other venomous animals, including snakes [3,4]. The yellow scorpion *Tityus serrulatus* (Ts) is the species primarily responsible for severe accidents because it is easily adapted to the urban environment [5,6]. In 2012, the Brazilian Ministry of Health reported approximately 63,000 cases of scorpion stings, and some of them led to death [3]. The mortality rate from scorpion stings is approximately 1.77% among children up to 14 years old, but most accidents occur in adults [7,8].



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts



Arthur Estanislau Dantas<sup>a</sup>, Carolina Campolina Rebello Horta<sup>b,c</sup>,  
Thais M.M. Martins<sup>a,d</sup>, Anderson Oliveira do Carmo<sup>b</sup>,  
Bárbara Bruna Ribeiro de Oliveira Mendes<sup>b</sup>, Alfredo M. Goes<sup>a</sup>,  
Evanguedes Kalapothakis<sup>b</sup>, Dawidson A. Gomes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2013

Received in revised form 27 March 2014

Accepted 3 April 2014

Available online 12 April 2014

#### Keywords:

Caspases

*Loxosceles similis*

Venom

Apoptosis

Necrosis

Cell death

### ABSTRACT

Spiders of the *Loxosceles* genus represent a risk to human health due to the systemic and necrotic effects of their bites. The main symptoms of these bites vary from dermonecrosis, observed in the majority of cases, to occasional systemic hemolysis and coagulopathy. Although the systemic effects are well characterized, the mechanisms of cell death triggered by the venom of these spiders are poorly characterized. In this study, we investigated the cell death mechanisms induced by the whole venom of the spider *Loxosceles similis* in human skin fibroblasts. Our results show that the venom initiates an apoptotic process and a caspase cascade involving the initiator caspase-9 and the effector caspases-3, -6, and -7.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) comprises 105 species of spiders (Platnick, 2013), and many of the species of this genus have attracted the attention of

**Abbreviations:** BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; EM, emission; EX, excitation; HFs, human fibroblasts; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

\* Corresponding author. Instituto de Ciências Biológicas, bloco Q4, sala 238, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail addresses: [dawidson@icb.ufmg.br](mailto:dawidson@icb.ufmg.br), [dawidson.gomes@gmail.com](mailto:dawidson.gomes@gmail.com) (D.A. Gomes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.002>

0041-0101/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

researchers due to the human health risk arising from the systemic and necrotic effects of their bites. In Brazil, where approximately 10,000 such bites are reported annually, there are eleven species of *Loxosceles* spiders, although only a few, such as *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849), *Loxosceles gaucho* (Gertsch, 1967), and *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão, 1934), represent a great risk for problematic bites. Recently, *Loxosceles similis* has been found inside residences in Belo Horizonte in the state of Minas Gerais, demonstrating the adaptability of this spider to the urban environment (Machado et al., 2005).

The condition caused by the bites of *Loxosceles* spiders is referred to as loxoscelism, which is characterized by many