

Thais Melo Mendes

**Antígenos para a produção de soro
contra o veneno do escorpião
*Tityus serrulatus***

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Belo Horizonte
2007**

Thais Melo Mendes

**Antígenos para a produção de soro
contra o veneno do escorpião
*Tityus serrulatus***

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia
e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Evanguedes Kalapothakis

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

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2007

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

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

Dedico esta dissertação ao Maurício
e à minha família

Agradecimentos

Ao meu orientador, Evanguedes Kalapothakis, que me ensinou quase tudo que sei de pesquisa e convívio dentro de um laboratório. Você é uma pessoa de muita moral e ética, e por causa de pessoas como você, ainda tenho esperança de um Brasil melhor.

À pesquisadora e amiga, Jovita E. Madeira Gazzinelli, que me acolheu em seu laboratório quando eu mais precisava. Você foi muito importante para mim.

Ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, principalmente a coordenadora Adelina Reis e a secretária Celinha, pela solicitude no processo da minha transferência.

Às minha amigas de bancada e doutorado, Andréa e Tatiana, que muito me ajudaram. Vocês são muito especiais, são pessoas muito prestativas e não vacilam na hora de ajudar quem precisa.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Ana Luíza, Ana Carolina, Ana Paula, André, Denise, Flavinha, Gabriel, Isabela, Maria, Tatiana e principalmente Carol, Anderson e Higgor, vocês me ajudaram muito e fizeram meus dias mais alegres.

Aos meus amigos da FUNED, principalmente a Gaucinha, Nayara e Elizete, ao pessoal do laboratório de Micologia e Micotoxinas, ao pessoal do IOM e do curso de atualização, vocês foram muito importantes.

Aos meus amigos da Veterinária, principalmente Felipe, Katarina, Rodrigo e Pricilla, que me agüentaram quando eu ia trabalhar lá. Ao Prof. Francisco Lobato que me disponibilizou seu laboratório.

Às minhas ex-colegas de laboratório e grandes amigas, Lucila, Cibebe, Flávia, Juliana e Fabíola, pela ajuda e amizade.

Aos colegas dos laboratórios dos Professores Carlos Chávez e Alfredo Góes, que sempre estavam dispostos a ajudar, principalmente a Lisa, que me ajudou a sangrar os camundongos e ao Ricardo que me ajudou com as purificações.

Aos meus amigos da Biologia, especialmente, Dani, Paty, Chabi, Ceça, Fábio, Fred Mirandinha, Millen, Sérgio, Lú Compart, Marquinhos e Dudu pela amizade e diversão que me proporcionam sempre que estou com eles.

Às minhas grandes amigas Rosana, Renata, Fê, e Simone pela amizade e apoio. Vocês moram no meu coração.

Aos meus amigos Dani, Pri, Val e Vinício pela amizade e diversão que me proporcionaram. Vocês sempre são bem vivos lá em casa para um filminho.

À minha grande família da rua Ligúria e à Diana e ao Willer pela amizade e incentivo.

Ao Maurício pelo amor e toda ajuda que me deu com a bioinformática e escrita da tese.

À minha família, Cida, Carlos, André, Bruno e Rodrigo, por todo amor, incentivo, apoio e ajuda que me deram durante a realização da tese e por toda minha vida.

Muito obrigada a todos vocês!

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
1 - Os Escorpiões.....	3
1.1 - Distribuição Geográfica e Classificação.....	3
1.2 – Morfologia.....	5
1.3 – Habitat e Hábitos.....	7
2 – Escorpionismo no Brasil e em Minas Gerais.....	8
2.1 – Introdução.....	8
2.2 – Epidemiologia.....	9
2.3 – Quadro Clínico.....	10
2.4 – Classificação Clínica e Tratamento Específico.....	12
3 – Veneno, Estrutura das toxinas e Modo de Ação.....	13
3.1 – Veneno.....	13
3.2 – Toxinas Escorpiônicas.....	15
3.2.1 – Toxinas que agem nos canais de sódio.....	16
3.2.2 – Toxinas que agem nos canais de potássio.....	20
3.2.3 – Toxinas que agem nos canais de cloro.....	24
3.2.4 – Toxinas que agem nos canais de cálcio.....	25
3.2.5 – Peptídeos sem pontes dissulfeto.....	28
3.3 – Toxinas do <i>Tityus serrulatus</i> e sua nomenclatura.....	29
3.3.1 – Toxinas que agem em canais de sódio.....	29
3.3.2 – Toxinas que agem em canais de potássio.....	38
4 – Os avanços na Soroterapia.....	41
Objetivo Geral.....	45
Objetivos Específicos.....	45
Justificativa.....	46
Materiais e Métodos.....	48
A – Reagentes, Meios de Cultura, Soluções.....	48
B – Genótipo das linhagens de bactéria utilizadas.....	54
C – Animais Utilizados.....	55
D - Preparo do estoque de bactérias.....	55
E – Metodologia.....	56
I - Obtenção do DNA das toxinas.....	59

1 - Obtenção do DNA de toxinas a partir do DNA genômico do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>.....	59
1.1 - Extração de DNA genômico do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	61
1.2 - Padronização da PCR e Amplificação dos DNAs das toxinas.....	62
1.3 - Clonagem dos DNAs no vetor pGEM T Easy vetor.....	63
1.3.1- Purificação de DNA pelo método da Sílica/Guanidina.....	63
1.3.2 – Ligação dos DNAs da TsTx-I e TsTx em pGEM.....	64
1.4 – Eletroporação.....	64
1.4.1 - Bactérias eletrocompetentes.....	64
1.4.2 – Protocolo de Eletroporação.....	65
1.5 – PCR de Colônia.....	66
1.6 – Purificação de plasmídeo por lise alcalina.....	67
1.7 - Corte com enzimas de restrição.....	68
1.8 – Seqüenciamento.....	68
1.9 - Análise computacionais das seqüências obtidas.....	69
2 - Busca de DNAs de toxinas na biblioteca de cDNA da glândula de veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>.....	70
2.1 - Biblioteca de DNA da glândula de veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	70
2.2 - T�tula��o da biblioteca.....	70
2.3 - Excisão em massa da sub-biblioteca 34.....	71
2.4 – Verificação da presença de insertos.....	72
2.5 – Análise das ESTs obtidas.....	74
II – Construção dos cassetes.....	75
1 - Construção de proteínas em tandem.....	75
1.1 - Clonagem do DNA da TsTx-I em pGEM.....	78
1.2 - Transformação química.....	79
1.2.1. - Bactérias químicamente competentes.....	79
1.2.2 - Transformação química.....	79
1.3 - Subclonagem do DNA da TsTx-I em pBluescript.....	80
1.3.1- Obtenção do pBluescript.....	80
1.3.2 - Purificação do DNA TsTx-I.....	81
1.3.3 - Desfosforilação de plasmídeo.....	81
1.3.4 - Ligação do DNA da TsTx-I no vetor pBluescript.....	82
1.4 - Montagem da TsTx-I com 2 cópias de DNA.....	86
1.5 - Montagem da TsTx-I com 4 cópias de DNA.....	87
1.5.1 – Subclonagem no vetor pBluescript.....	87
1.5.2 – Clonagem no vetor pET 11a.....	87

2 - Construção da proteína quimérica.....	90
2.1 – Obtenção do DNA da TsNTxP.....	92
2.2 – Ligação do DNA da TsNTxP ao pBluescript+TsTx-I.....	92
2.3 – Obtenção do DNA da TsTx.....	93
2.4 - Ligação do DNA da TsTx ao pBluescript+TsTx-I+TsNTxP.....	94
III - Expressão.....	95
1 - Sistema de expressão.....	95
2 - Expressão piloto e curva de expressão da proteína recombinante em células de bactérias da linhagem BL21 DE 3.....	97
3 - Expressão em larga escala.....	98
4 – Expressão no fermentador.....	98
5 - Lise celular.....	99
6 - Dosagem de proteínas.....	100
7 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	101
8 – ELISA.....	101
9 - Western Blotting.....	102
IV- Produção de soros e teste de potência.....	102
1 - Imunização dos animais.....	102
1.1 – Imunização dos camundongos.....	102
1.2 – Imunização dos coelhos.....	103
2 - Titulação dos soros dos animais.....	103
3 – Determinação da DL ₅₀	104
4 - Neutralização <i>in vitro</i>	104
5 - Capacidade de proteção após vacinação.....	104
V - Análise dos dados.....	105
1 - Análise estatística.....	105
Resultados.....	106
I - Obtenção do DNA das toxinas.....	106
1 - Obtenção dos DNAs das proteínas TsTx e TsTx-I do DNA genômico do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	106
2 - Busca de DNAs de toxinas na biblioteca de DNAs da glândula de veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	110
2.1 - Excisão em massa da biblioteca.....	110
2.2 - Seqüenciamento e análise dos dados.....	110
II – Construção dos cassetes.....	120
1 - Construção de proteínas em tandem.....	120
1.1 - Clonagem do DNA da TsTx-I em pGEM.....	120

1.2 - Subclonagem do DNA da TsTx-I no vetor pBluescript II KS-.....	122
1.3 – Clonagem do DNA da TsTx-I ₍₁₎ no pET 11a.....	126
1.4 – Montagem da TsTx-I ₍₂₎	131
1.5 – Montagem da TsTx-I ₍₄₎	135
2 - Construção da proteína quimérica.....	146
2.1 - Clonagem do DNA da TsNTxP (amplificado do pMAL) no vetor pGEM.....	146
2.2 - Subclonagem do DNA da TsNTxP no vetor pBluescript contendo o DNA da TsTx-I.....	148
2.3 - Clonagem do DNA da TsTx em pGEM.....	150
2.4 - Subclonagem do DNA da TsTx no vetor pBluescript contendo o DNA da TsTx-I+TsNTxP.....	152
III – Expressão e Caracterização das proteínas recombinantes.....	156
1 – Expressão piloto da TsTx-I ₍₂₎	156
2 – Expressão em larga escala da TsTx-I ₍₂₎	159
3 – Teste de expressão TsTx-I ₍₂₎	160
4 – Expressão em Larga Escala e Lise Bacteriana TsTx-I ₍₂₎	161
5 – Western blotting da TsTx-I ₍₂₎	165
6 – Tentativa para produzir a proteína recombinante TsTx-I ₍₂₎ solúvel.....	167
7 – Expressão da BL21 e BL21/pET.....	169
8 – Tentativa de reduzir a formação da proteína de 14 kDa.....	170
9 – Teste de dissolução da proteína recombinante TsTx-I ₍₂₎	173
10 – ELISA da TsTx-I ₍₂₎	177
11 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I ₍₂₎	178
12- Expressão piloto da TsTx-I ₍₁₎	179
13 – Expressão em larga escala da TsTx-I ₍₁₎ e lise bacteriana.....	180
14 – Western blotting da TsTx-I ₍₁₎	181
15 – Expressão da TsTx-I ₍₁₎ no Fermentador.....	182
16 – Purificação por cromatografia da TsTx-I ₍₁₎	184
17 – Teste de dissolução da proteína recombinante TsTx-I ₍₁₎	186
18 – ELISA da TsTx-I ₍₁₎	188
IV- Produção de soros e teste de potência.....	190
1 – Determinação da DL ₅₀ do veneno do <i>Tityus serrulatus</i>	190
2 – Titulação dos soros.....	192
2.1 – Titulação dos soros dos coelhos.....	192
2.2 – Titulação dos soros dos camundongos.....	195
3 – Ensaio de neutralização.....	196
3.1 – Neutralização <i>in vitro</i>	196

3.2 – Capacidade de proteção após vacinação.....	197
3.3 – Comparação da titulação dos soros dos camundongos antes e depois do desafio	200
Discussão.....	203
Conclusões.....	217
Pespectivas.....	218
Referências.....	219

Índice de Figuras

Figura 1 – Principais espécies brasileiras de escorpiões perigosos.	4
Figura 2 – Desenho esquemático do escorpião. Vista dorsal e ventral do escorpião..	6
Figura 3 – Toxinas que agem em canais de sódio..	20
Figura 4 – Toxinas que agem em canais de potássio.	23
Figura 5 – Toxinas que agem em canais de cloro..	24
Figura 6 – Toxinas que agem em canais de cálcio.....	27
Figura 7 – Toxinas do veneno do <i>T. serrulatus</i> que agem em canais de sódio..	35
Figura 8 – Seqüências do cDNA e DNA genômico da TsTx-I..	36
Figura 9 – Seqüências do cDNA e DNA gênomico da TsTx.	37
Figura 10 – Toxinas do veneno do <i>T. serrulatus</i> que agem em canais de potássio... ..	40
Figura 11 – Esquema da metodologia utilizada.....	56
Figura 12 – Procedimentos utilizados nas etapas de clonagem.....	57
Figura 13 – Vetores de fácil clonagem.	58
Figura 14 – Primers construídos para clonagem das proteínas de interesse..	60
Figura 15 – Mapa do vetor pBluescript II KS +/-..	76
Figura 16 – Construção de proteínas em Tandem da TsTx-I.....	77
Figura 17 - Construção da proteína quimérica.	91
Figura 18 - Representação esquemática e mapa da região MCS do vetor pET 11a... ..	96
Figura 19 - Extração do DNA genômico e obtenção do DNA das toxinas.	108
Figura 20 – Corte com enzima de restrição dos clones da TsTx e TsTx-I em pGEM.....	109
Figura 21 – Análise da seqüência da TsTx-I obtida na biblioteca.....	111
Figura 22 – Análise da seqüência da TsTx obtida na Biblioteca..	112
Figura 23 – Distribuição dos tamanhos das ESTs.	113
Figura 24 – Proporção relativa de cada categoria dos transcritos da biblioteca de cDNA da glândula de veneno do <i>Tityus serrulatus</i>	114
Figura 25 - Proporção relativa de cada categoria dos <i>Uniques</i>	115
Figura 26 – Anotação das ESTs com Gene Ontology.....	116
Figura 27 – Anotação das <i>Uniques</i> com Gene Ontology.....	117
Figura 28 – Construção das proteínas recombinantes a partir da seqüência da TsTx-I no vetor pET 11a.....	120
Figura 29 – Amplificação e purificação do DNA da TsTx-I do clone obtido da biblioteca..	121
Figura 30 – Purificação do DNA da TsTx-I e desfosforilação do plasmídeo cortado..	123
Figura 31 – Corte com enzima de restrição Hind III dos clones da TsTx-I clonados no pBluescript..	124

Figura 32 – Análise da sequência do clone 14 no programa Blastx.....	125
Figura 33 – Construção dos primers para a clonagem da TsTx-I ₍₁₎ no pET 11a.	127
Figura 34 – Amplificação e purificação do fragmento de DNA TsTx-I ₍₁₎ e verificação da clonagem.....	128
Figura 35 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I ₍₁₎ no vetor pET 11a.....	129
Figura 36 – Confirmação da ligação TsTx-I ₍₁₎ no pET.....	130
Figura 37 – Clonagem da TsTx-I ₍₂₎ nos vetores de fácil clonagem.	132
Figura 38 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I ₍₂₎ no vetor pET 11a.....	133
Figura 39 – Confirmação da ligação TsTx-I ₍₂₎ no pET.....	134
Figura 40 – Construção dos primers para a clonagem da TsTx-I ₍₂₎ /Eco no clone 14.	136
Figura 41 – Clonagem da TsTx-I ₍₂₎ (Eco) nos vetores de fácil clonagem.	137
Figura 42 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I ₍₂₎ (Eco) no clone 14.....	138
Figura 43 – PCR para confirmação da ligação da TsTx-I ₍₂₎ (Eco) no clone 14..	139
Figura 44– Construção dos primers para a clonagem da TsTx-I ₍₄₎ no pET 11a.	141
Figura 45 – Clonagem da TsTx-I ₍₄₎ em pGEM..	142
Figura 46 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I ₍₄₎ no pET 11a.	143
Figura 47 – Corte com enzima de restrição para confirmação da ligação da TsTx-I ₍₄₎ em pET.....	144
Figura 48 – Seqüenciamento da TsTx-I ₍₄₎ em tandem no vetor pET 11a..	145
Figura 49 – Construção da proteína recombinante quimérica no vetor pBluescript.	146
Figura 50 – Amplificação, purificação e clonagem do DNA da TsNTxP em pGEM.. ...	147
Figura 51 – Clonagem do DNA da TsNTxP nos clones 14 e 16 da TsTx-I (di e mono)..	149
Figura 52 – Clonagem do DNA da TsTx no pGEM.....	151
Figura 53 – Clonagem do DNA da TsTx no vetor pBluescript contendo o DNA da TsTx-I +TsNTxP.....	153
Figura 54 – Verificação da clonagem do DNA da TsTx no pBluescript contendo o DNA da TsTx-I+TsNTxP.....	154
Figura 55 – Seqüenciamento das construções quiméricas..	155
Figura 56 – Expressão piloto da proteína recombinante TsTx-I ₍₂₎	157
Figura 57 - Curva de expressão dos clones da proteína recombinante TsTx-I ₍₂₎ em BL21 (DE3).....	158
Figura 58 - Expressão em larga escala da proteína recombinante TsTx-I ₍₂₎	159
Figura 59 – Triagem das colônias recombinantes da TsTx-I ₍₂₎ que estavam expressando.....	160
Figura 60 – As duas metodologias utilizadas para expressão em larga escala da TsTx-I ₍₂₎	162
Figura 61 – Lise bacteriana após expressão em larga escala da TsTx-I ₍₂₎ utilizando a primeira metodologia..	163

Figura 62 - Lise bacteriana após expressão em larga escala da TsTx-I ₍₂₎ utilizando a segunda metodologia.....	164
Figura 63 – Western blotting da TsTx-I ₍₂₎	166
Figura 64 – Expressão da TsTx-I ₍₂₎ em fermentador.....	168
Figura 65 – Expressão de proteínas nas bactérias BL21 e BL21/pET.....	169
Figura 66 – Processos para tentar evitar o surgimento da proteína de 14 kDa..	172
Figura 67 – Solubilização das proteínas insolúveis do pellet da lise da expressão da TsTx-I ₍₂₎	175
Figura 68 - Solubilização com SDS das proteínas insolúveis do pellet da lise da expressão da TsTx-I ₍₂₎	176
Figura 69 – Reatividade da TsTx-I ₍₂₎ frente ao soro anti-veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	177
Figura 70 – Triagem de colônias que expressam a proteína recombinante TsTx-I ₍₁₎	179
Figura 71 – Expressão em larga escala e lise bacteriana da expressão da TsTx-I ₍₁₎	180
Figura 72 – Western blotting da proteína recombinante TsTx-I ₍₁₎	181
Figura 73 – Expressão da TsTx-I ₍₁₎ no fermentador. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie.....	183
Figura 74 – Tentativa de purificação da TsTx-I ₍₁₎ em coluna C8 no HPLC..	185
Figura 75 – Solubilização da proteína TsTx-I ₍₁₎ recombinante insolúvel.....	187
Figura 76 – Reatividade da proteína recombinante TsTx-I ₍₁₎ frente ao veneno do <i>Tityus serrulatus</i>	188
Figura 77 – Titulação do soro anti-veneno total de <i>Tityus serrulatus</i>	192
Figura 78 – Titulação dos soros dos animais imunizados com TsTx-I ₍₁₎ e TsTx-I ₍₂₎ ..	194
Figura 79 – Titulação dos soros dos camundongos imunizados.....	195
Figura 80 – Titulação do pool dos soros dos camundongos imunizados antes e depois do desafio com veneno..	202

Índice de tabelas

Tabela 1 – Acidentes escorpiônicos: classificação, manifestações clínicas e tratamento *	12
Tabela 2 - Principais trabalhos de purificação de toxinas do veneno do <i>T. serrulatus</i> , nas décadas de 60 a 80.	31
Tabela 3 – Uniformização dos nomes das toxinas de <i>T. serrulatus</i>	34
Tabela 4 – Identificação dos transcritos que possuem homologia com toxinas ou componentes do veneno	118
Tabela 5 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I ₍₂₎	178
Tabela 6 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I ₍₁₎	189
Tabela 7 – Determinação da DL ₅₀ do veneno bruto	190
Tabela 8 - Determinação da DL ₅₀ do veneno liofilizado	191
Tabela 9 - Determinação da DL ₅₀ do veneno bruto que foi liofilizado	191
Tabela 10 – Neutralização <i>in vitro</i>	196
Tabela 11 – Cálculo de quantidade de veneno a ser usada proporcional ao peso...	198
Tabela 12 – Capacidade de neutralização após vacinação	199

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
Amp	Ampicilina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovino
Cols.	Colaboradores
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DL ₅₀	Dose letal de 50%
DNA	Ácido dexosirribonucléico
_{ss} DNA	DNA fita simples (única)
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotritol
eag	Gene ether-a-go-go de <i>Drosophila melanogaster</i>
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GOA	<i>Gene Ontology Annotation</i>
HERG	Gene humano homólogo ao gene eag
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICK	<i>Inibidor cystine knot</i>
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
Kb	Quilobase
KDa	Quilo Dalton
LacZ	Gene que codifica a β-galactosidase
Lb	Meio de Cultura Luria-Bertani
M	Molar
mAb	Anticorpo monoclonal
MBP	Proteína ligadora de maltose
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
mM	Mili-Molar
mg	Mili-grama
mL	Mililitro
μF	microFaraday
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrometro
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
OPD	Ortofenilenodiamino
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogenionte
PHRAP	<i>PHRagment Assembly Program</i>
PHRED	<i>Phil's Read Editor</i>
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 ribonucleico
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
Swiss prot	Protein knowledgebase of Swiss Institute
T ₄ DNA ligase	DNA ligase do bacteriófago
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Taq DNA polimerase	DNA polimerase termoestável do <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TrEMBL	<i>Translated EMBL</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TsNTxP	<i>Tityus serrulatus non-toxic protein</i>
U	Unidade de enzima
UniProt	<i>The Univesal Protein Resourse</i>
U.V.	Ultra Violeta
V	Volts
x-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactose

Lista de Abreviaturas de Nomes de Escorpiões

Abreviaturas	Nomes completos
AaH	<i>Androctonus australis</i> Hector
Amm	<i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>
Be	<i>Buthus eupeus</i>
Bj	<i>Buthotus judaicus</i>
BmK	<i>Buthus martensi</i> Karsch
Bo	<i>Buthus occitanus</i>
Bom	<i>Buthus occitanus mardochei</i>
Bs	<i>Buthus sindicus</i>
Bot	<i>Buthus occitanus tunetanus</i>
Ce	<i>Centruroides exilimanus</i>
Cex	<i>Centruroides exilicauda</i>
Cg	<i>Centruroides gracilis</i>
Cl	<i>Centruroides limbatus</i>
Cll	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>
Cm	<i>Centruroides margaritatus</i>
Cn	<i>Centruroides noxius</i> Hoffmann
CsE	<i>Centruroides sculpturatus</i> Ewing
Css	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>
Ha	<i>Hadrurus aztecus</i>
Hf	<i>Heterometrus fulvies</i>
Hs	<i>Heterometrus soubufer</i>
Lqh	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>
Lqq	<i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>
Oc	<i>Opisthophthalmus carinatus</i>
Om	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>
Os	<i>Orthochirus scrobiculosus</i>
Pg	<i>Parabuthus granulatus</i>
Pi	<i>Pandinus imperator</i>
Ps	<i>Parabuthus schlechteri</i>
Pt	<i>Parabuthus transvaalicus</i>
Pv	<i>Parabuthus villosus</i>
Sm	<i>Scorpion maurus palmatus</i>
Tb	<i>Tityus bahiensis</i>
Tc	<i>Tityus cambridgei</i>
Tco	<i>Tityus costatus</i>
Ts	<i>Tityus serrulatus</i>
Tst	<i>Tityus stigmurus</i>
Tz	<i>Tityus zulianus</i>

Lista de Abreviaturas de Nomes de Toxinas

A maioria das toxinas usam como abreviações as primeiras letras dos nomes científicos dos escorpiões, seguido de um número romano ou arábico que significa a ordem de purificação ou é relativo ao pico de purificação. Exemplo: AaH II, *Androctonus australis* Hector, e esta toxina foi a segunda a ser purificada do veneno deste escorpião. Algumas ainda trazem na abreviatura de seus nomes, as letras **IT** que significa tóxicas para insetos. Exemplo: Aah IT 4. Outras ainda especificam se as toxinas são do tipo α ou β . Exemplos: Lqh α IT ou BmTx κ β . Outras explicitam a ação da toxina, excitatória \rightarrow xtr. Exemplo: Bjxtr IT. Outras trazem as letras Tx para indicar toxina. Exemplo: TsTx V, toxina V do *Tityus serrulatus*. As letras Erg indicam que estas toxinas agem em canais ERG. Exemplo: Cn **Erg** 1. Mas muitas tem nome que não possuem relação direta com o nome científico do escorpião e as usadas neste trabalho estão descritas na tabela abaixo.

Abreviação	Nome da toxina	Escorpião
AgTx 1 e 2	Agitoxinas	Lqh
BeKm	Toxina do Be age em canais de K tipo m	Be
BmK CT	Toxina do BmK homóloga a clorotoxina	BmK
BmKTx	Toxinas do BmK inibidoras de canais de K	BmK
BmP 01, 02, 05	Peptídeos do BmK que inibe canais SKCa	BmK
CITx	Clorotoxina	Lqh
CTx	Caribdotoxina	Lqh
CoTx 1 e 2	Cobatoxinas	CnH
ErgTx	Ergtoxina	CnH
HgTx 1	Hongotoxina	Cl
HfTx 1 e 2	Hefutoxinas	Hf
I 1, 3, 4, 5 e 5A	Insetotoxinas	Be
IbTx	Iberiotoxina	Bt
IpTx A	Imperatoxina ativador	Pi
IpTx I	Imperatoxina inibidor	Pi
Is CT e 2	Peptídeos lineares citotóxicos	Om
KL I e II	Kurtoxia-like	Pg
Ktx	Kurttoxina	Pt
KTx	Kaliotoxina	Amm
LbTx	Limbatotoxina	Cl
LeTx I	Leiurotoxina	Lqh

Lp I	Leuropeptideos	Lqh
Mca	Maurocalcina	Sm
MgTx	Margatoxina	Cm
MTx	Maurotoxina	Sm
NTx	Noxiustoxina	CnH
Opc	Opicalcina	Oc
PB ITx 1	Peptideo tipo insetotoxina	Ps
PBTx 1	Parabutoxinas	Pv e Pt
Pi 1, 2 e 3	Pandinotoxinas	Pi
P01 e 05	Peptideos inibidores SKCa	Amm
TmTx	Tamulotoxina	Bt
Ts κ	Tityus kappa	Ts
Ty κ α	Tityustoxina II	Ts

Resumo

Os escorpiões são animais que possuem veneno para capturarem presas e se defender. Estes venenos possuem toxinas que agem em canais iônicos de vários seres vivos. Algumas peçonhas são muito tóxicas para os mamíferos, inclusive o homem, podendo levar até a morte. No Brasil, existem algumas espécies de escorpiões perigosos à saúde e há uma grande preocupação em relação aos acidentes. Desde a década de 60, pesquisadores vêm estudando a peçonha dos escorpiões. E apesar de já existir um soro anti-escorpiônico eficaz, ainda existem problemas na sua produção e uso. Portanto, para o desenvolvimento de um soro de melhor qualidade ou até mesmo uma vacina, é necessário um conhecimento maior sobre a composição e ação do veneno.

Nosso grupo está envolvido na busca de novos imunôgenos para a produção de soro. Com este objetivo, nós fizemos uma busca por novas toxinas na biblioteca de cDNAs da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, disponível em nosso laboratório. Como resultado obtivemos várias seqüências de nucleotídeos codificando proteínas similares a toxinas. Os cDNAs das duas principais toxinas do veneno do *T. serrulatus*, TsTx e TsTx-I, foram obtidos. Em conjunto com a seqüência de nucleotídeos codificante para a TsNTxP, eles foram usados para construções de cassetes de expressão. Estes foram construídos através de inserção em um vetor plasmidial de cópias de genes em série (em tandem) ou uma cópia de genes diferentes, codificando proteínas diferentes (quimera).

Duas construções foram utilizadas para ensaios de expressão em bactérias e as proteínas recombinantes obtidas foram inoculadas em animais, para a produção de anticorpos. Estes foram testados e se mostraram capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno total do *T. serrulatus*. Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas possibilidades para a produção de soro anti-escorpiônico utilizando-se como antígeno às proteínas recombinantes descritas aqui. O avanço mais importante obtido foi a determinação da capacidade da toxina recombinante TsTx-I de produzir anticorpos com o poder de neutralizar o veneno do *Tityus serrulatus*, uma vez que ainda não havia estudos nesta área com esta toxina.

Abstract

Scorpions are animals that use venom to capture preys and to defend themselves. These venoms possess toxins that act in ionic channels of many organisms. Some poisons are very toxic for mammals, including man, and may cause death. In Brazil, there are some species of scorpions dangerous to human health and there is a great concern relative to accidents.

Since the decade of 60, researchers are studying scorpion venom. Although already exist an effective anti-scorpionic serum, problems in its production and use still exist. Therefore, for the development of a better quality serum or even a vaccine, it is necessary a greater knowledge of the venom composition and action.

Our group is involved in the search of new imunogens for anti-venom production. To achieve such purpose, a search for new toxins in a cDNA library of *Tityus serrulatus* venom gland was carried out. As result several nucleotide sequences coding for toxin-like proteins were identified. cDNAs of two main toxins of the *T. serrulatus* venom, TsTx and TsTx-I, were obtained and used with the cDNA of TsNTxP, in the constructions of expression cassettes. These were constructed by insertion into a plasmidial vector of copies of genes in series (in tandem) or a copy of different genes, encoding proteins different (chimera).

Two constructions were used for bacterial expression assays and the obtained recombinant proteins inoculated in animals, for antibodies production. The antibodies were tested and neutralized the toxic effects of the *T. serrulatus* crude venom. The results obtained in this work open new possibilities for the production of anti-scorpionic serum using the recombinant proteins described here as antigen. The most important advancement was obtained to determine the ability of the recombinant toxin TsTx - I to produce antibodies with the power to neutralize the *Tityus serrulatus* venom since it had not yet studies in this area with this toxin.

Introdução

1- Os Escorpiões

1.1- Distribuição Geográfica e Classificação

Existe a comprovação da existência dos escorpiões há mais de 400 milhões de anos. Foram os primeiros artrópodes a conquistar o ambiente terrestre e desde então não passaram por modificações morfológicas importantes.

Possuem ampla distribuição geográfica por todos os continentes, com exceção da Antártica (Lourenço, 2004). Nas Américas, eles se distribuem do Canadá até a Patagônia e na região Paleártica (Europa, Ásia até o Himalaia e África setentrional até o Saara), se distribuem do leste e centro da Europa até a Rússia e China. Eles são presentes em todas as regiões tropicais do mundo e recentemente foram introduzidos na Nova Zelândia (Lourenço, 1988; Sissom, 1990).

Os escorpiões pertencem à classe Arachnida, ordem Scorpionidae, distribuí-se em nove famílias e existem 1500 espécies conhecidas. Todos os escorpiões potencialmente perigosos ao homem pertencem à família Buthidae, a única família que tem ampla distribuição pelo mundo, e é a maior em número de gêneros (48) e espécies, com aproximadamente 500 (Lourenço, 2004). Somente 25 espécies podem ser consideradas perigosas ao homem. A família Buthidae inclui quatro subfamílias, que são responsáveis pelos casos sérios de picadas por escorpiões pelo mundo: *Isometrinae*, *Buthinae*, *Centrurinae* e *Tityinae* (Büchel, 1971). Os gêneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Buthotus* e *Heterometrus* pertencem à subfamília Buthinae e são originários da África, principalmente no norte, Oriente Médio e Índia (Balozet, 1971). O gênero *Parabuthus* tem sido relatado no Sul da África (Debont e cols., 1998). A subfamília Centrurinae é composta por escorpiões da América do Norte e Central (Bravo-Becherelle e Mazzotti, 1961; Dehesa-Davila e Possani, 1994), enquanto escorpiões da subfamília Tityinae (*Tityus*) são originários da América do Sul e Trinidad e Tobago (Bücherl, 1971). No Brasil ocorrem 5 cinco gêneros de Buthidae: *Isometrus*, *Ananteris*, *Microtityus*, *Rhopalurus* e *Tityus*. A esse último pertencem às espécies responsáveis pelos acidentes humanos:

Tityus serrulatus, o mais importante, seguido por *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. cambridgei* e *T. trivittatus* (Figura 1).



www.butantan.gov.br



www.butantan.gov.br



www.butantan.gov.br



www.fafibe.br



www.efn.uncor.edu

Figura 1– Principais espécies brasileiras de escorpiões perigosos.

1.2 – Morfologia

O corpo dos aracnídeos é subdividido em duas regiões, o prossoma (cefalotórax) que compreende a cabeça e os membros e o opistossoma (abdômen). O prossoma é não-segmentado e o opistossoma é segmentado. O abdômen do escorpião é dividido em uma região larga anterior chamada mesossoma (pré-abdômen) de 8 segmentos e uma região longa posterior, o metassoma (pós-abdômen) ou cauda de 5 segmentos com um ferrão, o telson, na sua extremidade. O abdômen tem uma carapaça onde se fixam os apêndices (Figura 2).

O primeiro par de apêndices consiste de quelíceras. Estas se posicionam acima da boca, possuem não mais de três segmentos e na maioria das ordens, tem a forma de garras. As quelíceras são pequenas nos escorpiões e as presas são seguras pelas pinças dos pedipalpos que formam o segundo par de apêndices. Depois dos pedipalpos, existem quatro pares de pernas. O ferrão do escorpião é curvo e pontudo. Sua base é mais larga e contém um par de glândulas de veneno. Na porção ventral do mesossoma, imediatamente abaixo do opérculo genital, estão duas pectinas, órgãos sensoriais parecidos com um pente, que não são achados em nenhum outro animal além dos escorpiões. As pectinas têm uma musculatura complexa, os dentes variam de três a mais de quarenta, dependendo do sexo e da espécie do escorpião, e são ricamente innervadas (Cloudsley-Thompson, 1968). Os olhos dos aracnídeos são simples ocelos, os escorpiões têm um par de olhos medianos e dois a cinco pares de olhos laterais na borda da carapaça.

Os escorpiões são dióicos e os sexos são separados, porém muito similares, exceto em algumas espécies, como *Tityus serrulatus* em que as fêmeas são partenogênicas e os machos aparentemente ausentes.

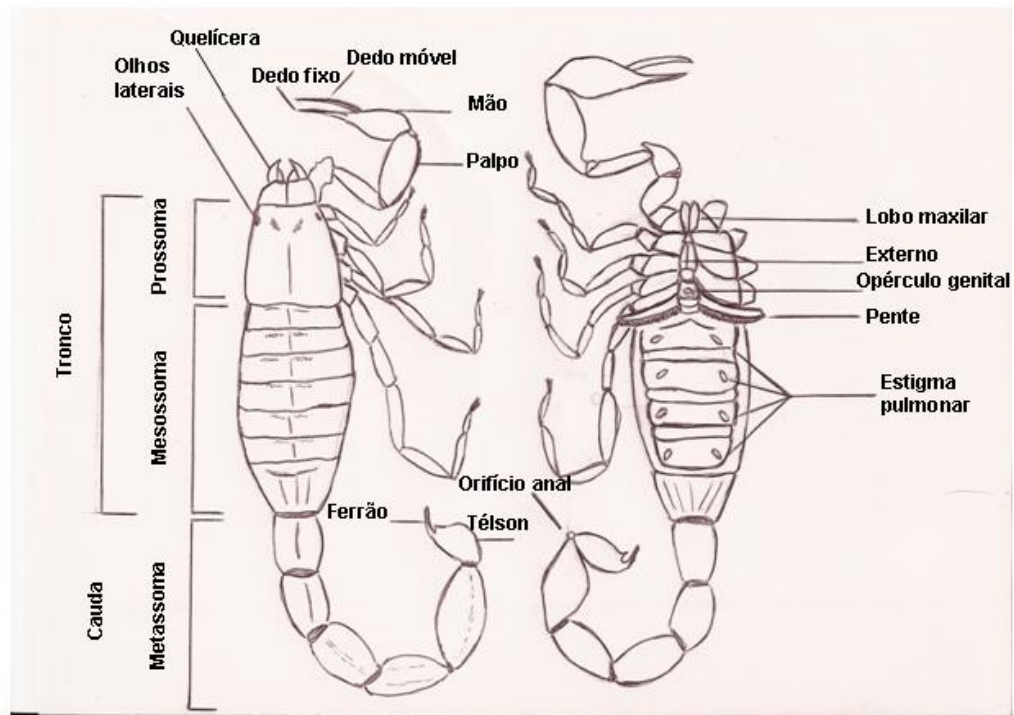


Figura 2 – Desenho esquemático do escorpião. Vista dorsal e ventral do escorpião. O mesossoma e o metassoma compõem o opistossoma. A cabeça e os membros compõem o prossoma. Desenho de Guarnieri (1998) adaptado por Thais Melo Mendes.

1.3 – Habitat e Hábitos

Os escorpiões têm sido capazes de ocupar os mais variados habitats e microhabitats terrestres. Eles são encontrados desde desertos (para o qual eles são muito bem adaptados) até florestas tropicais (onde chove muito), incluindo todas as zonas vegetais intermediárias. Alguns têm habitat em matas e florestas inundáveis, alojados no solo e em copas de árvores de mais de 40 metros de altura, como o *Tityus cambridgei*. Eles são encontrados em altitudes altas como 5500 metros, nos Andes (ex. *Orobothriurus crassimanus* Maury – Bothriuridae), e em cavernas com profundidades de 800 metros (ex. *Alacran tartarus* Francke – Chactidae)(Lourenço e Francke, 1985; Lourenço, 1988).

Os escorpiões são subsociais, os jovens são levados nas costas da mãe até a primeira muda. Algumas espécies de escorpiões têm vida solitária e tendem a evitar uns aos outros, mas também podem ser encontrados em grupos como é o caso do *T. serrulatus*. Eles são noturnos, passando os dias em buracos e fendas sob rochas, pedras e troncos caídos, de onde saem à noite à procura da presa (Ministério da Saúde, 2001). Encontram ainda esconderijos junto às habitações humanas, em entulhos de construção e sob dormentes dos trens (Guarnieri, 1998).

A atividade ao longo do ano também é variável. A maioria das espécies de escorpiões são mais ativos durante os meses mais quentes do ano. Durante os meses mais frios, a atividade é menor, especialmente nas espécies que vivem em altas latitudes e grandes altitudes (Guarnieri, 1998).

Os escorpiões são carnívoros alimentando-se exclusivamente de animais vivos. Quando não há alimento disponível, eles baixam o metabolismo e ficam de jejum absoluto. Nem sempre a peçonha é utilizada para a captura de presas, muitas vezes somente os palpos são utilizados para segurar a vítima, normalmente insetos (Guarnieri, 1998).

Esses animais apesar de serem predadores ativos e possuírem peçonha, não estão livres de inimigos naturais. Entre eles encontram-se vários parasitas e predadores, como outros artrópodes, anfíbios, lagartos, serpentes, aves e alguns mamíferos (Guarnieri, 1998).

2 – Escorpionismo no Brasil e em Minas Gerais

2.1 – Introdução

Escorpionismo é o processo de envenenamento causado pela picada de escorpiões.

O *T. serrulatus* e o *T. bahiensis* são as espécies mais comuns e responsáveis pela grande maioria dos acidentes escorpiônicos no Brasil (Ministério da Saúde, 2001). São animais que podem atingir até 7 cm de comprimento e possuem algumas diferenças morfológicas mais evidentes. A cor predominante do *T. serrulatus* é o amarelo e no quarto segmento da cauda possuem duas fileiras de serrilhas, o que caracteriza a espécie. Já a cor predominante do *T. bahiensis* é o marrom escuro e as tíbias dos palpos possuem manchas nítidas, também escuras.

Os escorpiões distribuem-se por todo país, e calcula-se por volta de 8000 casos anuais de acidentes, sendo que os estados de Minas Gerais e de São Paulo concentram perto de 50% dos casos (Ministério da Saúde, 2001).

Em Minas Gerais, o escorpião *T. serrulatus* é responsável pela maioria dos acidentes e dos óbitos que ocorrem em decorrência da picada de escorpiões. O centro de referência de Belo Horizonte para acidentes com animais peçonhentos é o Hospital João XXIII – Serviço de Toxicologia.

2.2 – Epidemiologia

No Centro de Toxicologia do Hospital João XXIII, no período de janeiro de 1972 e a dezembro de 1987 foram admitidos 3660 pacientes picados pelo *T. serrulatus*. Desses 73% eram adultos e 27% eram crianças com idade variando entre 0 a 14 anos. A taxa de mortalidade entre esses pacientes foi baixa (0,28%). Importante salientar que todos os pacientes mortos eram crianças que haviam sido internadas no hospital com mais de três horas do acidente ter ocorrido (Freire-Maia e Campos, 1989).

A partir da implantação da notificação dos acidentes escorpiônicos no país, vem se verificando um aumento significativo no número de casos. Entre janeiro de 1990 e dezembro de 1993 foram notificados 24.826 casos, sendo que 0,4% eram crianças com menos de um ano (taxa de mortalidade de 4%) e 28% eram crianças entre 1 e 14 anos, taxa de mortalidade de 1,7% (Ministério da Saúde, 2001).

A partir de 2001, houve um grande aumento no número de casos de acidentes escorpiônicos atendidos no Hospital João XXIII: 2001 cerca de 7000 casos sem casos fatais, 2002 cerca de 6000 casos com 2 fatais e 2003 cerca de 8000 casos com 1 fatal. O chefe do Centro de Toxicologia, Doutor Délio Campolina, acredita que esse grande aumento se dá principalmente pelo aumento das notificações e não pelo aumento do número de casos. Isso porque está havendo muitas campanhas e propagandas alertando a população sobre o risco que os escorpiões representam e a importância de procurar com rapidez o atendimento hospitalar (comunicação pessoal).

2.3 – Quadro Clínico

Dado que os mediadores químicos liberados pelas toxinas escorpiônicas atuam na maioria dos sistemas do organismo, os sinais e sintomas são variados e o quadro clínico estabelecido vai depender da predominância dos efeitos ora da acetilcolina, ora da adrenalina e noradrenalina. No sistema nervoso autônomo, alguns dos efeitos da adrenalina são: aumento da frequência, da força e da automaticidade do coração; diminuição da motilidade do trato gastrointestinal; secreção das glândulas salivares e gliconeogênese no fígado. Já a acetilcolina causa diminuição da frequência, da força e da velocidade de condução do coração; aumento da motilidade do trato gastrointestinal; secreção das glândulas salivares e lacrimais (Rang e cols., 1997).

As manifestações podem ser divididas didaticamente em locais e sistêmica, que vão definir o acidente como leve, moderado e grave.

- Sinais e Sintomas Locais

A dor é um sintoma sempre presente e a intensidade com que pode se manifestar dependerá não só da sensibilidade individual como também da quantidade de veneno inoculada nos tecidos (Hering e cols., 1992).

Pode ser muito leve, quase imperceptível nos casos benignos, até muito intensa e quase insuportável nos casos mais severos. A dor pode estar limitada ao ponto de inoculação, sob a forma de ardor, semelhante à queimação, ferroadas ou agulhadas, pode aumentar de intensidade à palpação e pode irradiar-se para grandes distâncias, como por exemplo até a raiz da extremidade acometida, fazendo-se sentir nesse local contínua, latejante, e por vezes mais intensa que no local da picada (Hering e cols., 1992).

Cessando a dor espontânea, pode permanecer, no local de inoculação, dor à palpação ou compressão, durante algum tempo, variando de horas até dias. Pode estar presente, além da hiperestesia (sensibilidade excessiva), parestesia (prurido).

O ponto ou pontos da picada nem sempre são visíveis. Hiperemia e edema, quando presentes, são geralmente discretos. Na maioria dos casos, a hiperemia se manifesta por um halo róseo em torno da picada; raramente é

bastante pronunciada, estendendo-se como mancha avermelhada ao redor do ponto da inoculação do veneno, aumentando de intensidade da periferia para o centro (Hering e cols., 1992).

Pode-se observar sudorese e alterações do equilíbrio térmico, assim como piloereção local ou mesmo no membro atingido pela picada.

- Sinais e Sintomas Sistêmicos

Os pacientes, principalmente as crianças, podem se apresentar muito agitados. Podem surgir tremores generalizados e, com o agravamento do quadro, os doentes podem passar da agitação psicomotora ao quadro de profundo torpor ou coma (Hering e cols., 1992).

A sudorese é um dos sintomas que chama bastante a atenção no escorpionismo humano, pois ela pode variar dependendo do caso. Pode ser leve, quase imperceptível, até se manifestar com grande intensidade, sob a forma de sudorese fria, generalizada e abundante. Pode vir acompanhada de alterações de temperatura corpórea, provocando geralmente hipotermia, causando sensação de frio.

Sialorréia (hipersalivação) e lacrimejamento são, junto com a dor, sintomas que aparecem muito precocemente. A salivação pode se muito abundante, assim como podem surgir lágrimas sem que o paciente esteja chorando.

Rinorréia (corrimento nasal), também de aparecimento precoce, pode atingir grande intensidade nos casos mais graves. Tosses e espirros aparecem com maior frequência nos casos mais graves, representando a hipersecreção traqueal e faríngea (Hering e cols., 1992).

A náusea aparece cedo, minutos após a picada, podendo variar na intensidade e frequência. Os vômitos podem ser muito discretos nos casos mais leves e profusos, contínuos e incoercíveis, nos casos mais graves. A intensidade das náuseas e principalmente dos vômitos está diretamente relacionada com a gravidade do acidente.

Podem estar presentes hipertensão ou hipotensão e arritmias variadas. Nos casos mais severos, insuficiência cardíaca e edema agudo de pulmão podem fazer parte do quadro clínico (Hering e cols., 1992).

2.4 – Classificação Clínica e Tratamento Específico

De acordo com a intensidade dos sintomas apresentados pelos pacientes picados, podemos classificar o escorpionismo humano em graus crescentes de gravidade, agrupando-os em casos leves, moderados ou graves, para fins de diagnóstico, orientação terapêutica e prognóstico (Tabela 1).

Tabela 1 – Acidentes escorpiônicos: classificação, manifestações clínicas e tratamento *

Classificação	Manifestações Clínicas	Tratamento	
		Específico	Geral
Leves	Somente presentes sinais e sintomas locais. Dor em 100% dos casos.	-	Combate à dor. Observação em ambiente hospitalar por 6-12 horas.
Moderados	Sintomatologia local e alguns sintomas sistêmicos tais como: agitação, sonolência, sudorese, náuseas, poucos vômitos, hipertensão arterial, taquicardia e taquipnéia.	2 - 3 ampolas de 5 mL com potência de 1 mg/mL principalmente para crianças até 7 anos de idade.	Combate à dor. Tratamento sintomático. Observação durante 12-24 horas
Graves	Sinais e sintomas locais e sistêmicos. Vômitos profusos e freqüentes. Náuseas, sialorréia, lacrimejamento, sudorese profusa, agitação, alteração de temperatura, taquicardia, hipertensão arterial, taquipnéia, tremores, espasmos musculares, paralisias até convulsão. Pode evoluir para bradicardia, bradpnéia, edema pulmonar agudo, colapso cardiocirculatório, coma e morte.	4 – 6 ampolas para todos pacientes.	Combate à dor. Internação hospitalar com cuidados intensivos. Tratamento sintomático. Monitorização e manutenção das funções vitais.

*Ministério da Saúde, 2001

A gravidade depende de fatores, como a espécie e tamanho do escorpião, a quantidade de veneno inoculado, região da picada, a massa corporal do acidentado e a sensibilidade do paciente ao veneno. Influem na evolução o diagnóstico precoce, o tempo decorrido entre a picada e a administração do soro e a manutenção das funções vitais (Ministério da Saúde, 2001).

O prognóstico geralmente é bom, principalmente nos acidentes de grau leve e moderado. No escorpionismo grave, as primeiras 24 horas são críticas, pois as complicações surgem dentro desse período, assim como a maioria dos óbitos.

3 – Veneno, Estrutura das toxinas e Modo de Ação

3.1 – Veneno

O veneno dos escorpiões é o resultado da secreção de um par de glândulas de origem tegumentar situadas no telson. Este tem forma bulbar que termina no aguilhão responsável pela inoculação do veneno.

A peçonha pode ser obtida por masceração da glândula ou estimulação elétrica do telson do animal. É uma substância mucosa, opalescente, com aspecto leitoso e solúvel em água. Por centrifugação pode-se obter uma fração insolúvel, que pode conter toxinas (Guarnieri e cols., 1998). A parte solúvel é uma mistura complexa, composta de muitas proteínas básicas de baixo massa molecular, aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídeos, aminas biogênicas e nucleotídeos, sendo desprovido de atividade proteolítica, hemolítica, colinesterásica, fosfolipásica e fibrinolítica (Zlotkin, 1978; Possani, 1984).

Alguns venenos possuem outras substâncias, como os das espécies *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *Palamneus gravimanus* que contém uma proteína de alto massa molecular com atividade hialuronidase (Diniz e Gonçalves, 1960; Possani e cols., 1977; Wright e cols., 1977). Essa proteína pode contribuir para toxicidade do veneno e ajudar a distribuir as toxinas pelos tecidos (Wright e cols., 1977). A peçonha do *Leirus quinquestriatus* possui serotonina (Adam e Weiss, 1958) e a do *P. gravimanus* tem histamina (Ismail e cols., 1975).

Vários pesquisadores se dedicaram ao estudo do mecanismo de ação

dos venenos de escorpião. Magalhaes (1928) acreditava ser a toxina escorpiônica neurotrópica e neurotóxica, realizou grande número de experiências animais, demonstrando ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre os núcleos vagais, postulando que o processo de intoxicação deveria se caracterizar por lesões bulbares.

Barros (1937, 1938) seguindo a mesma linha de investigação, verificou em experiências animais que as lesões provocadas pelo veneno situavam-se preferencialmente no bulbo, mesencéfalo e protuberância, o que explicaria as alterações nos sistemas gastrointestinal, circulatório e respiratório.

No entanto, estudos posteriores demonstraram que os locais de ação dos venenos escorpiônicos não deveriam estar localizados no sistema nervoso central, visto que a maioria dos seus efeitos ainda era observada em animais espinalectomizados e em órgãos isolados (Hering e cols., 1992).

Somente após Gomez e Diniz (1966) isolarem, a partir do veneno bruto de *T. serrulatus*, uma fração purificada (tityustoxina), foi realizada uma série de pesquisas sistemáticas levando à demonstração da natureza periférica das ações das toxinas.

Atualmente está bem estabelecido que as toxinas de escorpião agem em canais iônicos no sistema nervoso periférico liberando mediadores químicos como acetilcolina e catecolaminas.

3.2 – Toxinas Escorpiônicas

As toxinas de escorpião são de natureza básica e de baixa massa molecular. Elas são divididas em quatro famílias diferentes de acordo com a sua especificidade de ligação aos canais iônicos: as que agem em canais de Na^+ (Rochat e cols., 1979; Catterall, 1980), canais de K^+ (Carbone e cols., 1982; Possani e cols., 1982; Miller e cols., 1985), canais de Cl^- (Debin e cols., 1993) e canais de Ca^{+2} (Valdivia e Possani, 1998).

As toxinas encontradas nos venenos de escorpião são compostas por duas principais populações de polipeptídeos. O primeiro inclui os pequenos peptídeos (menores que 40 aminoácidos) que afetam os canais de potássio (Miller e cols., 1985) e de cloro (Debin e cols., 1993), e o segundo consiste de várias classes de toxinas longas (60-70 aminoácidos) que afetam os canais de sódio (Zlotkin e cols., 1978; Rochat e cols., 1979). As toxinas que bloqueiam canais de cálcio são um grupo muito heterogêneo, composto por toxinas de cadeia tanto longa e quanto curta (Valdivia e cols., 1992; Chuang e cols., 1998; Fajloun e cols., 2000; Mosbah e cols., 2000; Olamendi-Portugal e cols., 2002).

Embora não exista similaridade de seqüência entre as toxinas longas e curtas, todas elas compartilham uma estrutura similar composta de uma ou duas α -hélice e 2 a 3 fitas folha β (Fontecilla-Camps, 1989; Miller e cols., 1985). Essa estrutura contém um motivo α -hélice estabilizado por cisteína (CSH), que envolve Cys-X-X-Cys na α -hélice ligado por duas pontes dissulfeto com Cys-X-Cys na folha β (Kobayashi e cols., 1991). Algumas toxinas que agem em canais de cálcio apresentam o motivo ICK, “inibidor cystine knot”, (Zhu e cols., 2003).

3.2.1 – Toxinas que agem nos canais de sódio

As primeiras toxinas a serem purificadas pertenciam a esse grupo (Gómez e Diniz, 1966; Miranda e cols., 1970). As toxinas que agem em canais de sódio são pequenos peptídeos de 58 a 76 resíduos de aminoácidos (6,5 a 8,5 kDa). Possuem estrutura comum com a topologia $\beta\alpha\beta\beta$, com voltas altamente variáveis conectando os principais elementos da estrutura secundária. A estrutura central é firmemente empacotada por três pontes dissulfeto conservadas e uma quarta que pode ter no mínimo três arranjos diferentes (Rodriguez De La Vega e Possani, 2005).

Até agora já foram descritas 230 estruturas primárias de toxinas de escorpião que agem em canais de sódio que foram purificadas de 40 espécies (Zhijian e cols., 2006).

Essas toxinas são divididas em dois grupos de acordo com seus efeitos farmacológicos e suas propriedades de ligação (Jover e cols., 1980; Couraud e cols., 1982; Gordon e cols., 1998). As toxinas α são aquelas que lentificam ou bloqueiam a inativação dos canais de sódio ligando-se no sítio 3 e as toxinas β são aquelas que afetam a ativação dos canais e agem ligando-se no sítio 4. Antigamente, achava-se que as toxinas α só eram encontradas em venenos de escorpiões do Velho Mundo (Eurafrásia) e que as β só eram encontradas em escorpiões do Novo Mundo (Américas). Mas hoje já se sabe que ambos os tipos de toxinas podem ser encontrados tanto nos venenos dos escorpiões do Novo Mundo quanto do Velho Mundo.

Na tentativa de entender melhor o modo de ação das toxinas ativas em canais de sódio, vários autores subdividiram as toxinas alfa e beta de acordo com o alvo de ação ou preferência filética, seqüência primária de aminoácidos, estrutura das toxinas, características de ligação (Gordon e cols., 1998; (Possani e cols., 1999; Froy e Gurevitz, 2003; Gordon e Gurevitz, 2003; De La Vega e Possani, 2007).

A subdivisão mais usada para as toxinas α é a divisão em clássicas, anti-inseto e tipo α . Essa subdivisão leva em conta tanto preferência filética como seqüência primária de aminoácidos (Figura 3). As toxinas alfa clássicas são altamente ativas em mamíferos, tem pouca toxicidade para alguns insetos

e baixa afinidade por membranas neuronais de insetos (Aah 2, Lqh 2). As anti-inseto tem alta toxicidade para alguns insetos, não compete com as toxinas clássicas em sinaptossomas de cérebro de rato e exibem baixa toxicidade para mamíferos quando injetadas intracerebroventricular (i.c.v), embora tenha alta atividade por via subcutânea (Lqh α IT, Lqq 3). Já as toxinas tipo- α mostram alta toxicidade por injeção i.c.v em camundongos e ratos, enquanto baixa atividade por via subcutânea, são moderadamente tóxicas para alguns insetos e elas competem com as anti-inseto em membranas neuronais de inseto, mas não competem com as clássicas em sinaptossomas de cérebro de rato (Lqh 3, Bom 3 e 4). Mas provavelmente, essas discrepâncias são devido às diferenças de receptores envolvidos nesses ensaios (Rodríguez de la Veja & Possani, 2005). Para classificarmos as toxinas de acordo com sua ação, é preciso testá-las nos mesmos tipos de preparações.

Para as toxinas β a divisão mais comum compreende as clássicas, tipo-Ts γ , anti-crustáceos, anti-insetos (depressoras e excitatórias). As clássicas são toxinas ativas em mamíferos e são exclusivamente encontradas em escorpiões do gênero *Centruroides* (Cn2, Css 2). As tipo-Ts γ são toxinas que tem alta toxicidade tanto para mamíferos como para insetos e são encontradas em escorpiões do gênero *Tityus* (Ts1, Tz1). As toxinas anti-crustáceos são aquelas que são tóxicas para crustáceos e/ou insetos e são encontradas nos venenos dos escorpiões do Novo Mundo (CII 1, Cn 5, Cn 10). As toxinas depressoras e excitatórias são específicas para insetos e são encontradas nos escorpiões do Velho Mundo Setentrional. As toxinas depressoras (LqhIT 2, LqqIT 2) induzem em insetos uma paralisia flácida com lenta depressão precedida por uma pequena fase transitória de contração e produzem uma inibição da excitabilidade devido à despolarização do axônio, e as excitatórias (AahIT, Bj-xtrIT) induzem em insetos uma rápida excitação que leva a uma contração e conseqüente paralisia e causa um disparo repetitivo nos axônios de baratas acompanhado de uma pequena despolarização (Goudet e cols., 2002); Rodríguez de la Vega & Possani, 2007).

Mas algumas toxinas não se enquadram corretamente em nenhuma classe. A toxina Cn 11 do escorpião *Centruroides noxius* é uma toxina anti-crustáceo, sua estrutura primária se assemelha com as toxinas β , mas tem

similaridade de seqüência com as outras toxinas anti-crustáceo de apenas 40% e com outras toxinas β similaridade entre 28-56%. Além disso, seu modo de ação é diferente, ela não afeta o mecanismo de abertura do canal de sódio, mas bloqueia a condutância dos íons Na^+ (Ramirez-Dominguez e cols., 2002).

Existem as toxinas que possuem seqüência típica de toxina β , mas atividade fisiológica tipo α , como as toxinas CsE v1 e v3, Cn12, CsE V, TsIV e TsTx V (Froy & Gurevitz, 2003; Bosmans & Tytgat, 2007). Ainda tem a toxina AahSTR 1 que possui similaridade de seqüência com as toxinas α do Velho Mundo, mas sua estrutura 3D assemelha-se as toxinas β do Novo Mundo (Froy & Gurevitz, 2003). Outra toxina peculiar é a AahIT4, que compete tanto com as toxinas α quanto com as β pelo sítio receptor em sinaptossomas de cérebro de rato, mas é reconhecida apenas por anticorpos anti-toxina β , Css2 (Loret e cols., 1991). Temos ainda a birtoxina isolada do veneno do *Parabuthus trasvaalicus*, que tem atividade tipo- β , apenas 3 pontes dissulfeto e alta similaridade com as toxinas β de *Centruroides* (Inceoglu e cols., 2001).

Vários peptídeos com estrutura típica de toxinas de cadeia longa (toxinas que agem em canais de sódio) possuem efeitos divergentes e não se enquadram nem como toxina α nem como β . Kurtoxina (Chuang e cols., 1998; Sidach e Mintz, 2002) e KL1 (Olamendi-Portugal e cols., 2002) modificam tanto a ativação quanto à inativação de canais de cálcio, embora tenha um efeito- α típico em canais de sódio. Phaiodotoxina, um modulador de canais de sódio isolado de um escorpião não-Buthide, afeta levemente o processo de abertura, mas aumenta muito a “corrente de janela” de canais de sódio para/TipE da mosca-da-fruta expressos em oócitos de *Xenopus* (Valdez-Cruz e cols., 2004). BmKAngM1 bloqueia correntes de sódio e potássio dependentes de voltagem em neurônios piramidais (Cao e cols., 2004). E mais impressionantes são as toxinas BmP09 (Yao e cols., 2005) e KAaH1 (Srairi-Abid e cols., 2005) que bloqueiam especificamente canais de potássio, apesar do fato de serem estruturalmente mais semelhantes com as toxinas que afetam canais de sódio.

Portanto, é preciso mais estudos e uma padronização dos ensaios farmacológicos e fisiológicos para o desenvolvimento de uma classificação mais adequada para as toxinas que agem em canais de sódio.

Toxinas α clássicas

AaH II -VKDGYIVDDV-NCTYFCGR-----NAYCNEE^CTK--LKGESGYCQWASPYGNA^CYCYKLPDHVRTKGP-----GRCH
 Lqq V -LKDGYIVDDK-NCTFFCGR-----NAYCNDE^CCKK--KGGESGYCQWASPYGNA^CWCYKLPDRVSIKEK-----GRCN
 Bot III -VKDGYIVDDR-NCTYFCGR-----NAYCNEE^CTK--LKGESGYCQWASPYGNA^CYCYKVPDHVRTKGP-----GRCN

Toxinas α anti-inseto

Lqq III -VRDAYIAKNY-NCVYECFR-----DSYCNDL^CTK--NGASSGYCQWAGKYGNA^CWCYALPDNVPIRVP-----GKCH
 Lqh α IT -VRDAYIAKNY-NCVYECFR-----DAYCNEL^CTK--NGASSGYCQWAGKYGNA^CWCYALPDNVPIRVP-----GKCR
 Bot IT1 -VRDAYIAQNY-NCVYFCMK-----DDYCNDL^CTK--NGASSGYCQWAGKYGNA^CWCYALPDNVPIRIP-----GKCHS

Toxinas tipo- α

Bom III -GRDGYIAQPE-NCVYHCFP---G-SSGCDTL^CKE--KGATSGHCGFLPGSGVAC^CCDNLPNKVPIVVG---GEKCH
 Lqh III -VRDGYIAQPE-NCVYHCFP---G-SSGCDTL^CKE--KGGTSGHCGFKVGHGLAC^CWCNALPNDVGIIIVE---GEKCHS

Toxinas α' - tem sequência de aminoácidos semelhante às toxinas β e modo de ação tipo α

CsEv1 -KEGYLVKKS-DGCKYD^CCFW--LGKNEHCNTE^CCAKNQGGSYGYCYA-----FACWCEGLPESTPTYPL-PN---KCS
 CsEv2 -KEGYLVNKST-DGCKYD^CCLK--LGENEGCDKE^CCAKNQGGSYGYCYA-----FACWCEGLPESTPTYPL-PN---KCS
 CsEv3 -KEGYLVKKS-DGCKYD^CCLK--LGENEGCDTE^CCAKNQGGSYGYCYA-----FACWCEGLPESTPTYPL-PN---KCS

Toxinas que tem estrutura semelhante às toxinas β e características farmacológicas tipo α

CsE V -KKDGYPVDSG-NCKYE^CCLK-----DDYCNDL^CLE--RKADKGYCYWGK---VSCYCYGLPDNSPTKTS-----GKCNPA
 Ts IV -KKDGYPVEYD-NCAYICWN---YDNAYCDKL^CCD--KKADSGYCYWVH---ILCYCYGLPSDEPTKTN-----GKCKSGKK
 TsTxV -KKDGYPVEGD-NCAFACFG---YDNAYCDKL^CCD--KKADSGYCYWVH---PD^CCYCYGLPEHILKEPTKTS---GRC

Toxinas β clássicas

Css II -KEGYLVSKST-DGCKYE^CCLK--LGDNDYCLRE^CCKQYQKSSGGYCYA-----FACWCTHLYEQAVVWPL-PNK--TCN
 CsE I -KDGYLVEK-T-GCKKT^CYK--LGENDFCNRE^CCKWKHIGGSYGYCYG-----FGCYCEGLPDSTQTWPL-PNK--TC
 Cn2 -KEGYLVDKNT-DGCKYE^CCLK--LGDNDYCLRE^CCKQYQKGGAGGYCYA-----FACWCTHLYEQAVVWPL-PNK--RCS
 Cn3 -KEGYLVELGT-DGCKYE^CCFK--LGDNDYCLRE^CCKARYGKGGAGGYCYA-----FGCWCTQLYEQAVVWPL-KNK--TCR

Toxinas β tipo Tsy

Ts VII -KEGYLMDHE--GCKLS^CCFI---RPSGYCGRE^CCI--KKGSSGYCAW-----PACYCYGLPNWVKVWDRATN---KC
 Tb 1 -KEGYLMDHE--GCKLS^CCFI---RPSGYCGSE^CCI--KKGSSGYCAW-----PACYCYGLPNWVKVWDRATN---KC
 Tb 2 -KEGYAMDHE--GCKFS^CCFI---RPSGFCDGYC^TKT--HLKASSGYCAW-----PACYCYGVPSNIVWVYATN---KC
 Tst 1 -KEGYLMDHE--GCKLS^CCFI---RPSGYCGRE^CCTL--KKGSSGYCAW-----PACYCYGLPNWVKVWDRATN---KC

Toxina com sequência de aminoácidos semelhante às toxinas α , mas estrutura 3D semelhante as β

AaHSTR 1 --ARDGYIVHDTNCKYS^CCFG---SEYKYCGPL^CE--KKKAKTGYCYL-----FACWCIEVPDEVRVWGE-DGF--MCWS

Toxina com 3 pontes dissulfeto e modo de ação tipo β

Birtoxina ADVPGNYPLDKDGNTYK^CFL--LGGNEEC^CLNVC^CKLHGV--QYGYCYASK-----CWCEYLEDDKDSV

Toxinas β anti-crustáceos e/ou anti-insetos

C11 1 -KEGYLVNKST-DGCKYD^CCFWL--GKNENCDKE^CCAKNQGGSYGYCYSF-----ACWCEGLPESTPTYPL--PNKS-CS
 Cn 1 -KDGYLVDA-K-GCKKN^CCYKL--GKNDCNRE^CCRMKHRGGSYGYCYSF-----GCYCEGLSDSTPTWPL--PNKT-C
 Cn 5 -KEGYLVNKST-DGCKYD^CCLLL--GKNENCDKE^CCAKNQGGSYGYCYAF-----GCWCEGLPESTPTYPL--PNKS-CS
 Cn 10 -KEGYLVNKST-DGCKYN^CCLIL--GENKNCDME^CCAKNQGGSYGYCYKL-----ACWCEGLPESTPTYPI--PGKT-CRT

Toxina β anti-crustáceo com sequência de aminoácidos semelhante as β , mas modo de ação diferente

Cn 11 -ARDGYPVDE-KGCKLS^CCLI---NDKW^CNSACHSR--GGKYGYCYTG---GLAC^CYCEAVPDNVKVWVWY--ETN-T-C

Toxinas β depressoras

LqhIT 2 --DGYIKRRD--GCKVAC^CLI---G-NEGCDKE^CKA--YGGSYGYCWTW---GLACWCEGLPDDKTWKSE--TN-T-CG
 LqqIT 2 --DGYIKRRD--GCKLS^CCLF---G-NEGCKNE^CKS--YGGSYGYCWTW---LACWCEGLPDEKTWKSE--TN-T-CG
 BjIT 2 --DGYIRKRD--GCKVSC^CII---G-NEGCRKE^CVA--HGGSFYGYCWTW---LACWCEGLPDVATWKSS--TN-T-CG
 BmK IT2 --DGYIKGKS--GCRVAC^CLI---G-NQGC^CLDKCR--YGASGYGYCWTW---LACWCEGLPDNKTWKSE--SN-T-CG

Toxinas β excitatórias

```
AaHIT 1 KKNKYAVDSS--GKAPELL-----SNYCNNQCTK-VHYADKGYCCL-----LSCYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTTIIN
LqqIT 1 KKNKYAVDSS--GKAPELL-----SNYCYNECTK-VHYADKGYCCL-----LSCYCFGLNDDKKVLEISDARKKYCDFVTIN
BjxtrIT KKNGYPLDRN--GKTTECSGVNAIAPHYCNSECTK-VYVAESGYCCW-----GACYCFGLEDDKPIGPMKDITKKYCDVQIIPS
BmK IT KKNKYAVDSS--GKVSELL-----NNYCNINCTK-VYYATSGYCCL-----LSCYCFGLDDDKAVLKIKDATKSYCDVQIIN
```

Toxina que compete tanto com α quanto com β , mas só é reconhecida com anticorpos anti- β

```
AaHIT 4 --EHGYLLNKYTGCKVWCVI-----NNEECGYLKRR--GGYYGYCYFWKL---ACYCQGARKSELWNY-K-TNK--CDL
```

Figura 3 – Toxinas que agem em canais de sódio. As cisteínas estão em destaque.

3.2.2 – Toxinas que agem nos canais de potássio

A primeira toxina de escorpião que age em canais de potássio foi identificada do veneno do escorpião *Centruroides noxius* e foi chamada de noxiustoxina NTx (Possani e cols., 1982). Desde então, aproximadamente 140 estruturas primárias foram descritas (Rodriguez De La Vega & Possani, 2004).

As toxinas que agem em canais de potássio (KTx) são compostas de 20-70 aminoácidos, mas a maioria tem menos que 40, possuem alta diversidade de seqüência de aminoácidos e são compactadas por 3 ou 4 pontes dissulfeto.

A nomenclatura destas toxinas está bem consolidada e foi inicialmente proposta por (Tytgat e cols., 1999). Ela se baseia no tamanho molecular, localização de cisteínas e similaridade de suas estruturas primárias, sendo assim as toxinas podem ser divididas em três famílias: α -KTx, β -KTx e γ -KTx (Tytgat e cols., 1999). Recentemente, uma nova família de toxinas que agem fracamente em canais de potássio foi identificada no veneno de escorpião e foram designadas como κ -KTx (Nirathanan e cols., 2005). Essa classificação é baseada mais na estrutura primária do que no perfil farmacológico, pois muitos peptídeos não tiveram seus alvos farmacológicos definidos e somente alguns já caracterizados possuem seletividade para somente um tipo de canal de potássio (Goudet e cols., 2002).

A α -KTx é uma família de toxinas de cadeia curta, que compreende a maioria dos membros dos peptídeos de escorpião que agem em canais de potássio e podem ser classificadas de acordo com sua estrutura primária em 19 subfamílias (Tytgat e cols., 1999; Wang e cols., 2000; Batista e cols., 2002;

Rodriguez De La Vega & Possani, 2004; Xu e cols., 2004; Olamendi-Portugal e cols., 2005; Wang e cols., 2005). A divisão em subfamílias e alguns de seus membros pode ser vista na Figura 4.

As β -KTxs são compostas de 60-65 aminoácidos e são compactadas por 3 pontes dissulfeto. Essa família tem quatro membros: AaTxK β , BmTxK β , BmTxK β 2 e TsTxK β (Rogowski e cols., 1994; Legros e cols., 1996; Zhu e cols., 1999). Somente TsTxK β foi caracterizada farmacologicamente, as outras foram isoladas através de clonagem molecular e pertencem a família β -KTx baseado nas estruturas primárias.

A toxina ErgTx, do *Centruroides noxius*, composta por 42 aminoácidos e compactada por 3 pontes dissulfeto (Gurrola e cols., 1999) foi definida como γ -KTx por causa de sua seqüência de aminoácidos e seu padrão de pontes dissulfeto distintas. ErgTx pode bloquear especificamente canais de potássio “delayed rectifier” em células musculares e nervosas e esses canais são codificados por um gene humano homólogo ao gene “ether-a-go-go” de *Drosophila melanogaster* (HERG) (Pardo-Lopez e cols., 2002). Esse gene foi assim nomeado por William D. Kapla em 1960 porque drosófilas com mutações neste gene quando anestesiadas com éter, mexiam suas pernas como as dançarinas de *strip-tease* “Go Go Grils” de um famoso bar noturno de Hollywood (www.en.wikipedia.org/wiki/HERG). Outras toxinas relacionadas foram descritas (Korolkova e cols., 2001, 2002; Corona e cols., 2002).

As poucas toxinas de cadeia curta da família κ -KTx isoladas dos venenos de *Heterometrus fulvies*, *Heterometrus soubufer* e *Opisthacanthus madagascariensis* foram assim designadas por causa de sua nova estrutura “bi-hélice” (Srinivasan e cols., 2002; Chagot e cols., 2005; Nirthanan e cols., 2005).

α -1.1	ChTx	---ZFTNVSCTTS-ECWSVCQRLHNTSRG-KCMN-KKCRCY--	LqH
α -1.3	IBTx	---ZFTDVDCSVSKECWSVCCKDLFGVDRG-KCMG-KKCRCYQ--	Bt
α -1.4	LbTx	---VFIDVSCSVSKECWAPCKAAVGTERG-KCMG-KKCRCY?--	Cl
α -2.1	NTx	---TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMN-GKCKCYNN-	CnH
α -2.2	MgTx	---TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMN-GKCKCYPH-	Cm
α -2.5	HgTx1	---TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMN-GKCKCYPH-	Cl
α -3.1	KTx	--GVEINVKCSGSPQCLKPCKDA-GMRFG-KCMN-RKCHCTPK-	Amm
α -3.4	AgTx	--GVPINVKCTGSPQCLKPCKDA-GMRFG-KCIN-GKCHCTPK-	LqH
α -3.6	BmKTx	---VGINVKCKHSGQCLKPCKDA-GMRFG-KCIN-GKCDCTPK-	BmK
α -4.1	TyK α (TsII-9)	---VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAG-KCMN-GKCKCYP--	Ts
α -4.2	Tsk	---VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATG-KCTN-GRCD-----	Ts
α -5.1	LeTxI (ScyTx)	-----AFCN-LRMQQLSCRS-LGLL-G-KCIG-DKCECVKH-	LqH
α -5.2	PO5	-----TVCN-LRRQQLSCRS-LGLL-G-DCIG-VKCECVKH-	Amm
α -5.3	BmPO5	-----AVCN-LKRQQLSCRS-LGLL-G-KCIG-DKCECVKH-	BmK
α -6.1	Pi1 (PiTx-Ky)	-----LVKCRGTSDCGRPQQQTGCPNS-KCIN-RMCKCYG-C	Pi
α -6.2	MTx	-----VSCGTGSKECYAPCRKQTGCPNA-KCIN-KSCKCYG-C	Sm
α -6.3	HsTx1	-----ASCRTPKDCADPCRKETGCPYG-KCMN-RKCKCNR-C	Hs
α -7.1	Pi2 (PiTx-K α)	-----TISCTNPKQCYPHCKKETGYPN-A-KCMN-RKCKCFGR-	Pi
α -7.2	Pi3 (PiTx-K β)	-----TISCTNEKQCYPHCKKETGYPN-A-KCMN-RKCKCFGR-	Pi
α -8.1	P01	-----VSC---EDCPEHCSTQ---KAQAKCDN-DKCVCEPI-	Amm
α -8.2	BmP01	-----ATC---EDCPEHCATQ---NARAKCDN-DKCVCEPK-	BmK
α -8.3	LqII	-----VSC---EDCPDHCSTQ---KARAKCDN-DKCVCEPI-	LqH
α -9.1	BmP02	-----VGC---EECPMHCKGK---NAKPTCDN-GVCNCNV--	BmK
α -9.3	LpI	-----VGC---EECPMHCKGK---NAKPTCDN-GVCNCNV--	LqH
α -10.1	CoTx1	-----AVCV-YRTCDKDKKRRGY-RSG-KCIN-NACKCYPY-	CnH
α -10.2	CoTx2	-----VACV-YRTCDKDKTSRKY-RSG-KCIN-NACKCYPY-	CnH
α -11.1	PBTx1	--DEEPKESCS-DEMCVIYCKGEEYSTGV--CDGPQKCKCSD--	Pt/Pv
α -11.2	PBTx2	--DEEPKETCS-DEMCVIYCKGEEYSTGV--CDGPQKCKCSD--	Pt/Pv
α -12.1	TsTxIV	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHG-KCMN-NKCRCYTN-	Ts
α -13.1	Tc1	-----ACG-S--CRKKCK-----GSG-KCIN-GRCKCY--	Tc
α -13.2	OsK2	-----ACG-PG-CSGSCR--QKGDRI-KCIN-GSCHCYP-	Os
α -14.1	Bmkk1	---TPFAIKCATDADCSRKCP---GNP-S--CRN-GFCACT--	BmK
α -15.1	Aa1	--QNETNKKCQGGG-CASVCRRVIGVAAG-KCIN-GRVCYYP-	AaH
α -15.2	BmTx3A	--QVETNVKCQGGG-CASVCRAIGVAAG-KCIN-GRVCYYP-	BmK
α -16.1	TmTX	---DLIDVKCISSQECWIACKKVTGRFEG-KCQN-RQCRCY--	Bt
α -16.2	Martentoxina	--FGLIDVKCFASSECWTACKKVTGSGQG-KCQN-NQCRCY--	Bm
α -17.1	TXKs4	-----QTQCQSVRDCQQYCLT----PD--RCSY-GTCYCKTT	Bm
α -18.1	Tc32	---TGPQTTCAAM-CEAGCKGLGKSMES--CQGDT-CKCKA-	Tc
α -19.1	BmBKTx	-----AACY-SSDCRVKCA-MGFSSG-KCINSK-CKCYK-	BmK
β -1	TsTXK β	KLVALI-PNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHNCNDIERKDGECHGFKCKCAKD	
β -2	AaTXK β	KLVKYAVPVGTLRTILQTVVHKVGKTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF	
β -3	BmTXK β	KNIEK-LTEVKDKMKHSWNKLTSMSEYACPVIEKWCEDHCAA-KKAIGKCEDTECKCLKLRK	
β -4	BmTXK β 2	KLVKYAVPEGTLRTIIQTAVHKLGKTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF	

γ -1.1	CnErg1	DRDS C VDKSR C AKYGYYQE C QD CCK KNAGHNGGT C MFFK CKCA
γ -1.2	CeErg1	-RDS C VDKSR C AKYGYYQE C TD CCK KYGHNGGT C MFFK CKCA
γ -1.3	CgErg1	-RDS C VDKSR C AKYGHYQE C TD CCK KYGHNGGT C MFFK CKCA
γ -1.4	CsErg1	-RDS C VDKSR C AKYGYYQE C QD CCK KAGHNGGT C MFFK CKCA
γ -1.5	CllErg1	-RDS C VDKSR C SKYGYYQE C QD CCK KAGHNGGT C MFFK CKCA
γ -1.6	CexErg1	-RDS C VDKSR C AKYGYYQE C QD CCK KAGHSGGT C MFFK CKCA
γ -2.1	BeKm-1	PTDIK C SESYQ C FPV C KSRFGKTNGR C VNGF CDCF
γ -3.1	CnErg2	-RDS C VNKS C AKYGYYQ C EV CCK KAGHKGGT C DFFK CKCKV
γ -3.2	CeErg2	-RDS C VDKSR C AKYGYYQ C EI CCK KAGHRGGT C EFFK CKCKV
γ -3.3	CsErg2	-RDS C VDKSR C AKYGYYQ C EV CCK KAGHRGGT C DFFK CKCKV
γ -3.4	CgErg2	-RDS C VDKSR C QKYGNYAQ C TA CCK KAGHNKGT C DFFK CKCT
γ -4.1	CllErg2	-RDS C VDKSK C SKYGYYGQ C DE CCK KAGDRAGN C VYFK CKCNP
γ -4.2	CnErg5	-RDS C VDKSK C GKYGYQ C QD CCK KNAGHNGGT C VYYK CKCNP
γ -4.3	CexErg2	-RDS C VDKSK C GKYGYGQ C DE CCK KAGDRAGI C EYYK CKCNP
γ -4.4	CexErg3	-RDS C VDKSK C AKYGYYYQ C DE CCK KAGDRAGT C EYFK CKCNP
γ -4.5	CexErg4	-RDS C VDKSQ C AKYGYYYQ C DE CCK KAGDRAGT C EYFK CKCNP
γ -4.6	CllErg3	-RDS C VDKSK C SKYGYYGQ C DK CCK KAGDRAGN C VYFK CKCNQ
γ -4.7	CllErg4	-RDS C VDKSK C AKYGYYGQ C DE CCK KAGDRAGN C VYLK CKCNQ
γ -4.8	CeErg3	-RDS C VDKSK C GKYGYHQ C DE CCK KAGDRAGN C VYYK CKCNP
γ -4.9	CsEerg3	-RDS C VDKSR C GKYGYGQ C DD CCK KAGDRAGT C VYYK CKCNP
γ -4.10	CsEerg4	-RDS C VDKSR C GKYGYGQ C DE CCK KAGDRAGT C VYYK CKCNP
γ -4.11	CnErg4	-RDS C VDKSQ C GKYGYGQ C DE CCK KAGERVGT C VYYK CKCNP
γ -4.12	CsEerg1	-RDS C VEKSK C GKYGYGQ C DE CCK KAGDRAGT C VYYK CKCNP
γ -4.13	CnErg3	-RDS C VDKSK C GKYGYGQ C DE CCK KAGDRAGT C VYYK CKCNP
γ -5.1	CsEerg5	-RDS C VDKSR C AKYGYYGQ C EV CCK KAGHNGGT C MFFK CMCVNSKMN
γ -5.1	CgErg5	-RDS C VDKSR C QKYGPYGQ C TD CCK KAGHTGGT C IYFK CKCGAESGR
k-1.1	HfTx1	-GHAC C -RNCWREGNDEET C KERC d
k-1.2	HfTx2	-GHAC C -RNCWREGNDEET C KERC g

Figura 4 – Toxinas que agem em canais de potássio. As cisteínas estão em destaque. A primeira informação que vem antes das seqüências é família e o número da toxina dentro da família. A segunda informação é o nome da toxina. Após as seqüências das toxinas da família α -KTx estão representadas as abreviações dos nomes dos escorpiões.

3.2.3– Toxinas que agem nos canais de cloro

Toxinas que agem em canais de cloro são polipeptídeos de baixa massa molecular, compostas por 35-38 aminoácidos e compactadas por 4 pontes dissulfeto (Figura 5). A estrutura primária destas toxinas tem similaridade de 50-74% uma com as outras e a localização das cisteínas é conservada entre elas. Até agora os membros das toxinas de escorpião que agem em canais de cloro e peptídeos similares incluem: I1, Ammp2, I3, I4, I5, I5A, peptídeos IBs, clorotoxina, Lqh-8/6, PBITx1, BmKCT, Bs8 e Bs14 (Tytgat e cols., 1998; Zeng e cols., 2000a).

Seu membro mais notável é a clorotoxina com 36 aminoácidos, purificada do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. Ela pode bloquear canais de cloro em epitélio de camundongo e pode também se ligar especificamente em canais de cloro em células gliais com efeitos patológicos ligados a inibição da metástase (Zhijian e cols., 2006).

Clorotoxina	M C MP C FTTDHQM A R K C DD C GGKGRG K C IGPQ C L C -R
I1	M C MP C FTTRPDMAQ Q C RA C CKGR--G K CFGPQ C L C GYD
Ammp2	C GP C FTTDPYTES K C AT C CGGR--G K CVGPQ C L C NR I
I3	M C MP C FTTDHQTARR C RD C CGGRGR-K C FG-Q C L C GYD
I4	M C MP C FTTDHNM A KK C RD C CGGN--G K CFGPQ C L C NR
I5	M C MP C FTTDPNM A NK C RD C CGG-G K -K C FGPQ C L C NR
I5A	M C MP C FTTDPNM A KK C RD C CGGN--G K CFGPQ C L C NR
Lqh-8/6	R C SP C FTTDQQM T KK C YD C GGKGKG K C YGPQ C I C APY
BmKCT	C GP C FTTDAN M ARK C RE C CGGI--G K CFGPQ C L C NR I
PBITX1	R C KP C FTTDPQ M SK K C ADx C GGx-Kx?
Bm12	C GP C FTTDAN M ARK C RE C CGGI--G K CFGPQ C K C NR I

Figura 5 – Toxinas que agem em canais de cloro. As cisteínas estão em destaque.

3.2.4– Toxinas que agem nos canais de cálcio

Várias toxinas de escorpião específicas para canais de cálcio vêm sendo isoladas: imperitoxinas (IpTxA e IpTxi) do escorpião *Pandinus imperator* (Valdivia & Possani, 1998) e maurocalcina (Mca) do escorpião *Scorpion maurus palmatus* (Fajloun e cols., 2000), que ativam o receptor de rianodina (Ryr), um canal de liberação de cálcio intracelular.

IpTxA e Mca são polipeptídeos de cadeia única ricos em aminoácidos básicos, compostas de 33 aminoácidos e compactadas por três pontes dissulfeto (Cys3-Cys17, Cys10-Cys21 e Cys16-Cys32), elas têm similaridade de 82%. IpTxi é um heterodímero de 15 kDa com uma subunidade grande de 104 aminoácidos compactada por quatro pontes dissulfeto e covalentemente ligada a uma subunidade pequena de 27 aminoácidos através da cisteína na posição 100.

A nova toxina, Kurtoxina (KTX), do veneno do *Parabuthus transvaalicus* se liga a canais de cálcio tipo T (subunidade α_{1G}) com alta afinidade e inibe o canal por modificação na abertura dependente de voltagem. Kurtoxina também interage com canais de sódio dependentes de voltagem e lentifica sua inativação (Chuang e cols., 1998).

Em adição, as toxinas tipo-kurtotoxina I e II do escorpião *Parabuthus granulatus* diminui a atividade de canais de cálcio do tipo-T em células espermato gênicas de camundongo e inibe o AR (reação acrossômica) em espermatozóides maduros (Lopez-Gonzalez e cols., 2003).

Recentemente, o comprimento total do cDNA codificador para homólogos da Maurocalcina e IpTxA foi isolado do escorpião *Opisthophthalmus carinatus*, que é intimamente relacionado com os escorpiões *Scorpion maurus* e *Pandinus imperator*, todos pertencentes à família Scorpionidae (Zhu e cols., 2003). Os peptídeos maduros deduzidos da sequência de cDNA compreendem 33 resíduos de aminoácidos e foram nomeados como Opicalcinas, que dividem alto grau de homologia com Maurocalcina e IpTxA (91 e 88%, respectivamente).

Mosbah e cols. (2000) mostraram que maurocalcina e IpTx A adotam o motivo ICK (“inhibitory cystine knot”). Esse motivo conservado

evolutionalmente é compartilhado por um grande grupo de polipeptídeos com diferentes seqüências e diversas bioatividades. Embora encontrado em vários filos (animal, planta, fungo), peptídeos ICK são mais freqüentes em venenos de caramujo marinho e aranhas. O motivo ICK é composto por três fitas antiparalelas folha β estabilizadas por pontes de cisteína e com muitas voltas (Norton & Pallaghy, 1998; Craik & Daly, 2005). Zhu e cols. (2003) demonstraram que Opicalcina 1 e 2 também adotam essa estrutura.

Em contraste, duas toxinas do escorpião *Buthus martensi Karsch*, BmK AS e BmK AS1, que são dois polipeptídeos de 66 aminoácidos compactado por quatro pontes dissulfeto com 86,3% de identidade entre elas, tem ação em receptores de rianodina (Ji e cols., 1997, 1999) e são capazes de inibir correntes de sódio em células NG108-15 (Wu e cols., 2001) e deprimem correntes de sódio resistentes e sensíveis a tetrodotoxina em pequenos neurônios DRG de ratos (Tan e cols., 2001). Essas toxinas revelam pouca similaridade com outros tipos conhecidos de toxinas de escorpião, tem somente alta similaridade de seqüência com uma toxina anti-inseto isolada do escorpião *Androctonus australis* Hector, AaH IT4, ativa em canais de sódio (Loret e cols., 1991). BmK AS e AS1 não são tóxicas para mamíferos e tem fraca toxicidade para insetos. Goudet e cols. (2002) sugerem que BmK AS e AS1 e AaH IT 4 formem uma nova família de toxinas inseticidas de escorpião.

A família das toxinas que agem em canais de cálcio é muito heterogênea, na Figura 6 podemos notar a diferença de seqüência de aminoácidos, quantidade de pontes dissulfetos, tamanho e estrutura.

IpTxi

Subunidade maior

MHTPKHAIQRISKEEMEFFEGR**C**ERMGEADETMWGTKW**C**SGNEATDISELGYWSNLDS**CC**RTHDH**C**DNI
PSGQTKYGLTNEGKYTMMN**CK****C**ETAFE**Q**CLRNVTGGMEGPAAGFVRKTYFDLYGNG**C**YNV**Q****C**PSQRRLAR

Subunidade menor

SEE**C**PDGVATYTG**E**AGYGAWAINKLNG

IpTxA GD**C**LPHLK**R****C**KADN-D**CC**G**K****C**KRRGTNAEK**R****C**R

Maurocalcina GD**C**LPHLKL**C**K-ENKD**CC**S**K****C**KRRGTNIEK**R****C**R

Opicalcina 1 GD**C**LPHLK**R****C**K-ENND**CC**S**K****C**KRRGTNPEK**K****C**R

BmKASI AS DNGYLLDKYT**G****C**KVW**C**VINNES**C**NSE**C**KIRGGYY**G****C**YFWKL**A****C****F****C**QGARKSELWNYNTNK**C**NGKL

BmKAS1 DNGYLLNKYT**G****C**KIW**C**VINNES**C**NSE**C**KLRRGNY**G****C**YFWKL**A****C****Y****C**EGAPKSELWAYETNK**C**NGKM

KTX KIDGYPVDYWN**C**KR**I****C**WYNNKY**C**NDL**C**KGLKADSGY**C**WGWTLS**C****Y****C**QGLPDNARIKRS**G**-**R****C**RA

KTX-like I KIDGYPVDNWN**C**KR**I****C**WYNNKY**C**YDL**C**KGLKADSGY**C**WGWTLS**C****Y****C**EGLPDNARIKRG**G**-**R****C**N

KTX-like II KIDGYPVDYWN**C**KR**I****C**WYNNKY**C**NDL**C**KGLKADSGY**C**WGWTLS**C****Y****C**QGLPDNARIKRS**G**-**R****C**RA

Figura 6 – Toxinas que agem em canais de cálcio. As cisteínas estão em destaque.

3.2.5– Peptídeos sem pontes dissulfeto

Comparando com as toxinas ricas em pontes dissulfeto, os peptídeos sem pontes dissulfeto são um novo tipo de polipeptídeos bioativos. Elas variam de tamanho entre 13-50 aminoácidos e compartilham baixos graus de similaridade (Luo e cols., 2005; Zeng e cols., 2005b). Até o momento, aproximadamente 26 peptídeos foram descritos: peptídeo T do *Tityus serrulatus* (Ferreira e cols., 1993), peptídeo K12 do *Buthus occitanus* (Meki e cols., 1995), Bs10 do *Buthus indicus* (Ali e cols., 1998), pandinina 1 e 2 do *Pandinus imperator* (Corzo e cols., 2001), Hadrurina do *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios e cols., 2000), IsCT e IsCT2 do *Opisthacanthus madagascariensis* (Dai e cols., 2001, 2002), parabutoporina do *Parabuthus schlechteri* (Verdonck e cols., 2000), opistoporina 1 e 2 do *Opistophtalmus carinatus* (Moerman e cols., 2002), BmKbpp, BmKn1, BmKn2, BmKa1, Bmka2 e BmKb1 do *Buthus martensii Karsch* (Zeng e cols., 2000b, 2001, 2004), Tco36.14-2, clones 4-10 do *Tityus costatus* (Diego-Garcia e cols., 2005).

Funcionalmente, os peptídeos de escorpião sem pontes dissulfeto são envolvidos na potenciação da bradicinina, poder antimicrobiano, iniciação da sinalização molecular da célula, modulação imune e muitas outras ações.

3.3 – Toxinas do *Tityus serrulatus* e sua nomenclatura

3.3.1 – Toxinas que agem em canais de sódio

A primeira purificação do veneno do *Tityus serrulatus* foi feita em 1966 por Gomez e Diniz. Eles combinaram gel filtração (Sephadex G-25) com cromatografia de troca iônica (CM-52). Na primeira purificação, obtiveram quatro picos, sendo que dois não eram tóxicos e dois eram. O segundo pico tóxico (T_2) foi recromatografado em coluna CM-52 e obtiveram somente um pico após eluição com acetato de amônia 0,15 M. Esse pico se apresentou homogêneo em eletroforese de papel. Esse componente tóxico foi chamado posteriormente de “Tityustoxina”.

“Tityustoxina” foi então parcialmente caracterizada por Gomez (1967) e isolada por Coutinho-Netto (1975) usando uma metodologia um pouco diferente (Sephadex G-50 e CM-52). Ele a chamou de TsTx (sem aspas) e caracterizou-a como uma proteína básica com ponto isoelétrico de 8,25, tendo apenas uma cadeia polipeptídica e 61 resíduos de aminoácidos.

Depois disso vários pesquisadores dedicaram seus trabalhos na caracterização dessa proteína. Os principais efeitos encontrados foram liberação de acetilcolina e outros neurotransmissores, supersensibilização pré- e pós-juncional, despolarização de membranas pré- e pós-sinápticas, potencialização do influxo do íon sódio, ativação de canais de sódio dependentes de voltagem (Gomez e cols., 1973; Diniz e cols., 1974; Warnick e cols., 1976; Drumond e cols., 1995; Gomez e cols., 1995). Kirsch e cols. (1989) através de estudos dos efeitos de TsTx em correntes de sódio em células e canal único determinaram que esta toxina pertence à classe das toxinas α .

Estudos subseqüentes do veneno do *T. serrulatus* realizados por Toledo e Neves (1976) resultou na purificação de duas novas toxinas, nomeadas de tityustoxina I, com N-terminal começando com lisina e massa molecular de 6932, e tityustoxina II, com glicina N-terminal e massa molecular de 8580.

O grupo do pesquisador Possani começou seus estudos com fracionamento do veneno do *T. serrulatus* em 1977, isolando 5 proteínas tóxicas. Uma delas, com massa molecular de 7000, 62 resíduos de aminoácidos e lisina N-terminal foi chamada de toxina γ e seus vinte e nove

primeiros aminoácidos foram seqüenciados. Em 1981, eles isolaram 10 componentes, sendo quatro purificados e parcialmente seqüenciados (Possani e cols., 1981).

A toxina gama foi purificada por outros grupos e foi alvo de diversos trabalhos que objetivaram determinar suas funções farmacológicas. Em 1982, Barhanin e cols. através de ensaios de ligação em sinaptossomas mostraram que toxina gama somente compete com toxinas do tipo β . Esse resultado foi comprovado por Yatani e cols. (1988) que verificaram que a toxina γ afetava o pico de permeabilidade do sódio em células cardíacas de maneira similar às toxinas β . Outros trabalhos mostraram que esta toxina é capaz de liberar diversos neurotransmissores em muitos órgãos (Sampaio e cols., 1983; Drumond e cols., 1995). Foi mostrado também que toxina gama se liga com alta afinidade tanto a canais de sódio de mamíferos (Barhanin e cols., 1984; Lombet e Lazdunski, 1984; Vijverberg e cols., 1984) quanto nos canais de sódio de insetos (Martin-Eauclaire e cols., 1985; Pauron e cols., 1985; De Lima e cols., 1986, 1988, 1989).

A partir daí vários grupos de pesquisadores começaram a fracionar o veneno deste escorpião por diferentes metodologias em busca de novas toxinas. Na tabela 2, está resumido os principais trabalhos e as toxinas isoladas, nas décadas de 60 a 80.

Tabela 2 - Principais trabalhos de purificação de toxinas do veneno do *T. serrulatus*, nas décadas de 60 a 80.

Pesquisadores	Ano	Método de purificação	Número de Toxinas Purificadas	Toxinas Caracterizadas	Ações das Toxinas
Gomez e Diniz	1966	Sephadex G-25 e Celulose CM-52	2 frações não tóxicas e 2 tóxicas	- Tityustoxina	DL ₅₀ 8,6µg/20g i.p.
Coutinho Netto	1975	Sephadex G-50 e Celulose CM-52	-	TsTx Seqüência parcial	
Toledo e Neves	1976	Sephadex G-50 e Celulose CM-52	2 toxinas	TsTx-I PM 6932 e K N-terminal TsTx-II PM 8580 e G N-terminal	
Possani e cols.	1977	Sephadex G-50 e Celulose CM-52	5 toxinas	Gama Seq. Parcial PM 7000 62 aa	
Possani e cols.	1981	Sephadex G-50 e Celulose CM-52 (2x pH 4,7 e 6)	10 toxinas Frações I-IV Subfrações II 1-11 III 1-10 IV 1-8	tóxicas II, III, IV II 9-11 III 7-8 IV 5,6,8 II-11 e III-10=δ II-11, III-10, III-8 e IV-5 seq. parciais	
Sampaio e cols.	1983	Sephadex G-25 e Celulose CM-52	2 Frações não tóxicas e 2 tóxicas T1 → 8 ptns T2 → 4 ptns	T ₂ III 63aa PM 7216 s. parcial T ₁ VIII 61aa PM 6675 s.p. T ₁ V ₁ 72aa PM 7549 s.p. T ₁ IV 45aa PM 5188 s.p. T ₂ IV = T ₁ VIII	T ₁ VIII em vaso deferente de cobaio causa contração espontânea e sensibilização pré-juncional
Martin-Eauclaire e cols.	1985	-	8 toxinas	5 β (sítio 4) e 3 α (sítio 3)	Canais de sódio
Arantes e cols.	1989	Celulose CM-52	8 frações I-VIII subfrações IX (5 toxinas) X (4 toxinas)	XIII = T ₁ VIII IX ₃ = T ₁ V ₁ X ₄ = T ₂ III IX ₅ e X ₃ = III-8 X ₂ → TsTx-IV 61aa PM 6885	

Como nas décadas de 60 a 80 o seqüenciamento de proteínas era uma técnica de difícil acesso, várias toxinas foram purificadas, mas poucas foram seqüenciadas completamente ou parcialmente. Além disso, apenas algumas foram caracterizadas, isso gerou uma grande confusão com relação à nomenclatura das toxinas do escorpião *T. serrulatus*. Os maiores problemas estão relacionados com os nomes das duas principais toxinas do veneno do *Tityus serrulatus*, inicialmente chamadas de tityustoxina (toxina α) e toxina gama (toxina β).

A toxina- α foi nomeada pelos diversos grupos de pesquisadores que a purificaram de TsTx, TsIV-5, TsIV, T₂III₁ e X₄ (Tabelas 2 e 3). Pelos trabalhos de Sampaio e cols. (1983) e Arantes e cols. (1989), TsTx, T₂III₁ e X₄ são a mesma toxina, mas elas não foram seqüenciadas, então eles se baseiam em suas características químicas e farmacológicas. E entre TsIV-5 e TsIV (que foram seqüenciadas) existe apenas uma diferença, a última possui extremidade C-terminal amidada.

Mas Arantes e cols. (1992), levantaram uma questão importante com relação a Tityustoxina. De acordo com eles, a expressão “Tityustoxina” foi usada no passado por vários autores, que em regra, se referiam ao trabalho inicial de Gomez e Diniz (1966). Mas na década de 90, esse nome designava pelo menos três entidades: 1) fração tóxica reportada por Gomez e Diniz, nome usado como “TsTx”, 2) neurotoxina TsTx (sem aspas) isolada por Coutinho Netto (1975) e 3) fração T1 da cromatografia em gel filtração da primeira purificação de Gomez e Diniz (Freire-Maia e cols., 1974; Almeida e cols., 1982; Novaes e cols., 1982; Azevedo e cols., 1983).

Arantes e cols. (1992) repetiram os procedimentos metodológicos de Gomez e Diniz para purificar “TsTx” e verificaram que a fração T2, que origina a “TsTx”, desdobrou-se em 4 picos, ao invés de um, como inicialmente descrito. E em gel de poliacrilamida a fração T2 mostrou-se muito heterogênea, assim como os 4 picos eluídos com 0,15M de acetado de amônia (concentração que “TsTx” foi eluída). Os autores concluíram que “TsTx” é uma mistura de proteínas e que TsTx é um componente dessa mistura encontrado em pequena quantidade. De acordo com suas características farmacológicas, parece certo afirmar que TsTx (sem aspas), TsIV e TsIV-5 são a mesma toxina (Martin-

Eauclaire e cols., 1994). TsIV e TsIV-5 já tiveram suas seqüências de aminoácidos e nucleotídeos determinada e realmente são a mesma toxina (Martin-Eauclaire e cols., 1994; Corona e cols., 1996), mas TsTx não tem a seqüência de aminoácidos completa, então não é possível afirmar com certeza.

Com relação à toxina- β , o problema começou com a purificação da TsTx-I, realizada por Toledo e Neves (1976). Pois nesse trabalho foi determinado apenas seu massa molecular e seu primeiro resíduo de aminoácido N-Terminal, sendo assim, outros pesquisadores purificaram essa toxina e a nomearam diferentemente: gama (Possani e cols., 1977), T₁VIII (Sampaio e cols., 1983), TsVII (Bechis e cols., 1984) e XIII (Arantes e cols., 1989). Mas hoje se sabe que todas elas são a mesma proteína (Arantes e cols., 1992), existe uma pequena diferença entre a gama e a TsVII, a última apresenta a cisteína C-Terminal amidada.

Outras toxinas também foram nomeadas de maneira diferente de acordo com o grupo de pesquisadores que as purificaram, mas agora com a facilidade do seqüenciamento de proteínas, clonagem e seqüenciamento de DNA, foi possível determinar quais as toxinas eram iguais, mas com nomes diferentes (Tabela 3).

Alguns grupos de pesquisadores estão propondo nomenclaturas para essas toxinas (Sampaio e cols., 1991; Becerril e cols., 1997). Na tabela abaixo, está descrita a nomenclatura que Sampaio e cols. (1991) sugerem; mas eles não fazem distinção entre toxinas que possuem alvo de ação diferente. Neste trabalho vamos adotar a nome que a toxina recebeu a primeira vez que foi descrita. Sendo assim, a toxina α vai ser chamada de TsTx e a principal toxina β vai ser chamada de TsTx-I.

Tabela 3 – Uniformização dos nomes das toxinas de *T. serrulatus*

Toxinas	Outros nomes	Canal de ação
TsTx	“TsTx” (Gomez e Diniz, 1966) TsTx (Coutinho Netto, 1975) TsIV-5 (Possani e cols., 1981) T ₂ III ₁ (Sampaio e cols., 1983) X ₄ (Arantes e cols., 1989) TsIV (Martin-Eauclaire e cols., 1994)	sódio
TsTx-I	TsTx-I (Toledo e Neves, 1976) Gama (Possani e cols., 1981) T ₁ VIII (Sampaio e cols., 1983) TsVII (Bechis e cols., 1984) XIII (Arantes e cols., 1989)	sódio
TsTx-II	TsTx-II (Toledo e Neves, 1976) T ₁ V ₁ (Sampaio e cols., 1983)	- (possivelmente sódio)
TsTx-III	T ₁ IV (Sampaio e cols., 1983) TsIII-8 (Possani e cols., 1985) TsII (Mansuelle e cols., 1992)	sódio
TsTx-IV	X ₂ (Arantes e cols., 1989) TsTx-IV (Novello e cols., 1999)	potássio
TsTx-V	XI ₂ (Arantes e cols., 1989) (Arantes e cols., 1994)	sódio
TsTx-VI	CM I S _I V _{II} (Sampaio e cols., 1997) TsTx-VI (Maragoni e cols., 1990)	-
TsTx-VII	CM I S _{III} II (Sampaio e cols., 1997)	potássio ou cálcio

A partir de 1984, vários grupos conseguiram determinar a seqüência completa de aminoácidos das principais toxinas do veneno do *Tityus serrulatus*: TsTx-I (Bechis e cols., 1984; Possani e cols., 1985), TsTx-VI (Maragoni e cols., 1990), TsTx-III (Mansuelle e cols., 1992) e TsTx (Martin-Eauclaire e cols., 1994). A seqüência de aminoácidos das toxinas de *Tityus serrulatus* que agem em canais de sódio já descritas podem ser vistas na Figura 7.

```

TsTx      KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCKDKKAD-SGYCYWVHILCCYGLPDS-EP--TK-TNGKC
TsTx-I    -KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIIKG-SSGYCAWPA--CCYGLPNWVKVWDR-ATN-KC
TsTx-II   GHPGK...
TsTx-III  -KEGYAMDHEGCKSFCFIRPAGFCDGYCKTHLKASSGYCAWPA--CCYGVDPHIKVWDDYATN-KC
TsTx-V    KKDGYPVEGDNCAFACFGYDNAYCDKLCKDKKADD-GYCVWSPD-CCYGLPEHILKEPTK-TSGRC
TsTx-VI   GREGYPADSKGCKITCFLTAAGYCNTECTLKKG-SSGYCAWPA--CCYGLPESVKIW-TSETN-KC
TsTx-VII  GHZGYGS...

```

Figura 7 – Toxinas do veneno do *T. serrulatus* que agem em canais de sódio. As cisteínas estão em destaque.

Com o advento da Biologia Molecular, as duas principais toxinas do veneno foram clonadas e tiveram seu gene amplificado do DNA genômico.

TsTx-I é sintetizada como um precursor de 252 pares de base codificando para 84 aminoácidos, dos quais 20 pertencem ao peptídeo sinal, este e os últimos 3 resíduos C-terminais são removidos pós-traducionalmente (Martin-Eauclaire e cols., 1992). Seu gene indica a presença de um intron de 475 pb que interrompe a região codificadora do peptídeo sinal do precursor, ficando o primeiro exon (55 pb) separado do segundo exon (260 pb) (Becerril e cols., 1993). A Figura 8 mostra o cDNA e o gene amplificado da TsTx-I.

TsTx tem características semelhantes: precursor de 357 pb codificando 80 aminoácidos, sendo que 13 correspondem ao peptídeo sinal (que não está completo), os 3 últimos resíduos sofrem processamento e são retirados (Figura 9). Uma diferença encontrada é que os autores purificaram 2 outras toxinas muito similares a TsTx e seus resultados suportam a idéia de processamento diferencial da região C-terminal do seu precursor (Martin-Eauclaire e cols., 1994); o que pode explicar os problemas encontrados na purificação desta toxina. Seu gene possui uma organização similar ao da TsTX-I: dois exons (28pb e 284pb) interrompidos por um intron (347 pb) (Corona e cols., 1996). Essa organização já foi reportada para outras toxinas, como AaH I (Delabre e cols., 1995) e KTx₂ (Laraba-Djebari e cols., 1994).

A.

```

CGAAGAARCAATCGATCTGAACG ATG AAA GGA ATG ATC TTG TTT ATT AGC TGC TTA TTG 58
      M K G M I L F I S C L L -9

CTG ATC GGC ATT GTC GTA GAA TGT AAA GAA GGT TAT CTC ATG GAT CAC GAA GGT 112
L I G I V V E C K E G Y L M D H E G 10

TGC AAA CTT AGT TGC TTT ATC AGA CCA TCG GGA TAC TGC GGC AGA GAA TGC GGA 166
C K L S C F I R P S G Y C G R E C G 28

ATT AAA AAG GGC TCA TCG GGC TAT TGC GCC TGG CCC GCG TGT TAC TGC TAC GGG 220
I K K G S S G Y C A W P A C Y C Y G 46

CTT CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAT AGA GCG ACG AAC AAA TGT GGC AAA AAA 274
L P N W V K V W D R A T N K C G K K 64

TAA ATTTGTTTCGCTGAAAATCCCTTTACAAATGAACGTGAATAAGTTTGGCAAAATAAAAATGTTTC 343
* 65

```

B.

```

TGGATCTGAACG ATG AAA GGA ATG ATC TTG TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC G 55
      M K G M I L F I S C L L L I -14

gtaagctgaattcagttttotaagtatatattttattatataaatataatgtatatattogctttaacaat 123

acacccatcataatgagctgttgtaataatctatcatcatgctatogtatacacacaatcattgaaacg 191

cgtagtattacagtagtatttgccagtttttatgaaaatatttaggttggttaagcagaattattttt 269

catogtttccatcaggaagagattattcccatctgtttgctactaatgtgttaagaaaatttatta 327

gtgtgtgttatcaatgcagattagcaattaaaaaatatacaaaacttatgtgaaatatataaagaaac 395

gttgacccaatttttaaatgtgattctcgtaaaattcatgtgcagagtcacacgttggtatgtgc 463

tatagaaatttttcataattatttagattactcaaaatgctaattggacttttttattttgttaacatag 530
.....
GC ATT GTC GTA GAA TGT AAA GAA GGT TAT CTC ATG GAT CAC GAA GGT TGC AAA 583
G I V V E C K E G Y L M D H E G C K 12

CIT AGT TGC TTT ATC AGA CCA TCG GGA TAC TGC GGC AGA GAA TGC GGA ATT AAA 637
L S C F I R P S G Y C G R E C G I K 30

AAG GGC TCA TCG GGC TAT TGC GCC TGG CCC GCG TGT TAC TGC TAC GGC CTT CCA 691
K G S S S G Y C A W P A C Y C Y G L P 48

AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAT AGA GCG ACG AAC AAA TGT GGC AAA AAA TAA ATC 745
N W V K V W D R A T N K C G K K end 64

TGTTTCGCTGAAAACCCCTTTTCAAAATGAACGTGAATAAGTTTGGC 790

```

Figura 8 – Seqüências do cDNA e DNA genômico da TsTx-I. Em A, seqüência de nucleotídeos do cDNA que codifica o precursor da TsTx-I, o peptídeo sinal está sublinhado, o stop códon está designado com um asterisco. Figura retirada do artigo de Martin-Eauclaire e cols., 1992. Em B, seqüência de nucleotídeos do DNA genômico que codifica o precursor da TsTx-I, o peptídeo sinal está sublinhado, o intron está em letra minúscula. Figura retirada do artigo de Becherril e cols., 1993.

A.

```

.....TTG GTC GTC GTC TGC TTA TTG ACC GCG GGC ACG
      L V V V C L L T A G T
GAG GGC AAG AAA GAC GGA TAC CCG GTG GAA TAC GAT AAC
E G K K D G Y P V E Y D N
      +1                               +10
TGC GGC TAC ATT TGC TGG AAC TAC GAC AAC GCT TAC TGC
C A Y I C W H Y D N A Y C
      +20
GAT AAG CTG TGC AAA GAC AAG AAA GCC GAT AGC GGA TAT
D K L C K D K K A D S G Y
      +30
TGT TAC TGG GTT CAC ATC CTG TGC TAC TGC TAC GGG CTT
C Y W V H I L C Y C Y G L
      +40                               +50
CCC GAT AGC GAA CCG ACC AAG ACC AAC GGA AAA TGC AAA
P D S E F T K T N G K C K
      +60
TCC GGT AAG AAG TAA ACCAGCCTCCTATTGATCCCAGATCCGCCCT
S G K K *
GGCGATAAATGTTTCTGAAAACCATTCCCGAAATAAACTCATGCCTGCA
AAAAAAAAAAAAAAAA

```

B.

```

...TTG GTC GTC GTC TGC TTA TTG ACC GCG Ggtaagattttcctcctattttgtcttctcta 59
      L V V V C L L T A -5
acgactccccgcgaattttaagcgcgcgccgttcttacaacaatttcgacaacgccatttcggaacgga 130
acggaagtactcagttatttcataatccgcgcctattactgcaccaaagtttttccgaagatctccgtg 201
taaatgaaaaggggacaccagaggggtctgtccgaaacagctattttccgacttattacaatggttaaccct 272
tttccggcttcgtccggccctggcgatcggacgaagctcggaagaacgctattttggatgcaagaccgtc 343
ttttactcagagtaacgactgttaaattttag GC ACG GAG GGC AAG AAA GAC GGA TAC CCG 404
      G T E G ..K.....K.....R.....G.....Y.....P... 6
GTG GAA TAC GAT AAC TGC GCC TAC ATT TGC TGG AAC TAC GAC AAC GCT TAC TGC 458
..Y. E Y D N C A Y I C W N Y D N A Y C 24
GAT AAG CTG TGC AAA GAC AAG AAA GCC GAT AGC GGA TAT TGT TAC TGG GTT CAC 512
D K L C K D K K A D S G Y C Y W V H 42
ATC CTG TGC TAC TGC TAC GGG CTT CCC GAT AGC GAA CCG ACC AAG ACC AAC GGA 566
I L C Y C Y G L P D S E P T K T N G 60
AAA TGC AAA TCC GGT AAG AAG TAA ACCAGCCTCCTATTGATCCCAGATCGCCCTGGCGGATAA 629
K C K S G K K End 67
AATGTTTCTGAAAACCATTCCCGAAATAAA 659

```

Figura 9 – Sequências do cDNA e DNA genômico da TsTx. Em A, sequência de nucleotídeos do cDNA que codifica o precursor da TsTx, o peptídeo sinal está sublinhado, o stop códon está designado com um asterisco. Figura retirada do artigo de Martin-Eauclaire e cols., 1994. Em B, sequência de nucleotídeos do DNA genômico que codifica o precursor da TsTx, o peptídeo sinal está sublinhado, o intron está em letra minúscula. Figura retirada do artigo de Corona e cols., 1996.

3.3.2 – Toxinas que agem em canais de potássio

As toxinas que agem em canais de potássio começaram a serem purificadas e descritas um pouco mais tarde do que as que agem em canais de sódio. A primeira toxina descrita foi noxiustoxina (NTx) purificada do veneno do escorpião *Centruroides noxius* (Carbone e cols., 1982). Neste mesmo ano, duas toxinas homólogas a NTx foram purificadas do veneno do *Tityus serrulatus*, e elas foram capazes de inibir corrente de K^+ em axônio gigante de lula, mesma preparação testada para NTx (Possani e cols., 1982, 1985). Elas foram chamadas de Ts II-9 e Ts II-10.2 e seus nucleotídeos foram parcialmente seqüenciadas.

Em 1991, Blaustein e cols. testaram 5 venenos de escorpiões do Velho Mundo e 2 do Novo Mundo quanto a sua capacidade de bloquear canais de K ativados por Ca^{+2} , abertos por voltagem que não possuem a fase de inativação (abertos \leftrightarrow fechados) e que possuem fase de inativação (inativados \leftrightarrow abertos \leftrightarrow fechados \leftrightarrow inativados), que são também chamados de tipo-A. Eles isolaram 5 componentes do veneno do *T. serrulatus* que bloqueavam a atividade de canais de K. Quatro destes foram estudados com detalhes e mostraram ter ação bloqueadora seletiva para canais de K “delayed rectifier” em sinaptossomas de cérebro de rato. Eles também observaram que essas toxinas não tinham ação em canais de K tipo-A. O peptídeo mais ativo tinha massa molecular de 3900, assemelhando-se com as outras toxinas que agem em canais de K. Também foi determinado o massa molecular de outro peptídeo, como sendo de 8160, tamanho não usual para esse tipo de toxina, sendo assim, deve ser um membro de uma nova classe estrutural de toxinas bloqueadores de canais de K.

Em 1993, o mesmo grupo de pesquisadores (Werkman e cols. 1993) investigaram a interação de TsTx $k\alpha$ com α -DTX (dendrototoxina - toxina de serpente) em $K_v1.2$ (canal de potássio dependente de voltagem) e verificaram que as 2 toxinas devem se ligar em sítios intimamente relacionados. Rogowski e cols. (1994) purificaram 2 peptídeos diferentes e os denominaram de TsTx $k\alpha$ (pequeno peptídeo) e de TsTx $k\beta$ (peptídeo grande). Os autores verificaram que as duas toxinas agem em canais de K não-inativadores, enquanto α -DTx e

ChTx agem nos inativadores. TsTx $k\alpha$ e ChTx, mas não TsTx $k\beta$, deslocam α -DTx-I¹²⁵ do seu sítio de ligação em sinaptossomas de cérebro de rato. Mas as três toxinas não compartilham o mesmo sítio. Mais tarde, Rodrigues e cols. (2003) mostram que TsTx $k\alpha$ também age em canais $K_v1.3$ expressos em 2 sistemas: oócito de *Xenopus* e células de mamíferos.

Quanto à toxina TsTx $k\beta$, Legros e cols. (1998) após clonar o cDNA desta toxina e de uma toxina homóloga do veneno do escorpião *Androctonus australis*, sugeriu que uma nova classe de toxinas ativas em canais de potássio fosse criada (β -KTxs). Essas toxinas possuem cadeia longa, 60 (TsTx $k\beta$) e 64 (AaTx $k\beta$) resíduos de aminoácidos, seus genes possuem peptídeo sinal, um pequeno pro-peptídeo e não possuem intron. Esta característica é compartilhada com as defensinas (proteínas da hemolinfa de escorpiões), que possuem 40% de similaridade de seqüência de aminoácidos com estas toxinas de cadeia longa. Através de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *Buthus martensis*, duas toxinas de cadeia longa bloqueadoras de canais de K foram descritas, BmTxK β com 61 aminoácidos e BmTxK β 2 com 64 (Zhu e cols., 1999). Os genes destas duas toxinas também têm peptídeo sinal, um pequeno pro-peptídeo e não possuem intron.

Após a descoberta da TsTx $k\alpha$ e TsTx $k\beta$ no veneno do *Tityus serrulatus*, outras toxinas que também eram bloqueadoras de canais de potássio foram descritas. Legros e colaboradores (1996) purificaram e caracterizaram uma nova toxina ligante do sítio de ligação da apamina em sinaptossomas de cérebro de rato, a Ts κ , uma proteína com 35 resíduos de aminoácido e 3 pontes dissulfeto. Ela age em canais de K ativados por Ca^{+2} , de baixa condutância (SK_{Ca}). Sua estrutura tridimensional foi determinada pela técnica de ressonância magnética nuclear (NMR), mostrando a existência de uma pequena α -hélice (14-20) e 3 fitas de folha β (2-3, 27-29 e 32-34) (Blanc e cols., 1997). Ts κ adota a conformação clássica $CS_{\alpha\beta}$ das toxinas de escorpião, mas o motivo estrutural é menor e sua arquitetura é mais similar às toxinas bloqueadoras de canais de K dependentes de voltagem. Lecomte e cols. (1999) sintetizaram quimicamente a Ts κ para identificar os pares de cisteínas (C1-C4, C2-C5 e C3-C6) e verificaram que os pares tinham a conformação típica para as toxinas de cadeia pequena.

Outra nova toxina foi purificada e sua seqüência de aminoácidos determinada (Novello e cols., 1999). A TsTx-IV tem 41 aminoácidos, massa molecular de 4520 Da e 4 pontes dissulfeto. Ela é capaz de bloquear canais de K ativados por Ca^{+2} de alta condutância (BK_{Ca}) e apresenta alta similaridade de seqüência primária com NTx (subfamília 2 – 68%), KTx (subfamília 2 – 65%) e Pi4 (subfamília 2 – 62%).

Em 2000, a Butantoxina foi purificada do veneno de 3 escorpiões: *Tityus serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus* (Holaday e cols., 2000). Essa toxina bloqueia reversivelmente canais Shaker B e inibe a proliferação de linfócitos T e produção de interleucina 2 de células T *helper* estimulados por antígeno. Sua estrutura tridimensional também foi determinada: 40 resíduos de aminoácidos, 4 pontes dissulfeto (2-5, 10-31, 16-36 e 20-38), α -hélice (15-23), 2 fitas de folha β (29-32 e 35-38) e uma pseudo-fita (5-9). Os autores concluíram que Butantoxina e TsTx-IV (descrita no trabalho de Novello e cols., 1999) eram a mesma toxina.

Na figura abaixo, estão as seqüências de aminoácidos de todas as toxinas bloqueadoras de canais de potássio do *T. serrulatus* descritas até o momento. Podemos ver que a posição das cisteínas é mantida em todas as toxinas.

TsTx k α (α -4.1)	VFINAKCRGSPE-CLPKCKEAIGKAAGKCMNGKCKCYP
Ts II-9	VFINAKCRGSPE-CLPKCKEAIGKAAGKCMN...
Ts II-10.2	TFIDVKCGSSKE-CLP...
Ts k (α -4.2)	VVIGQRCYRSPD-CYSACKKLVGKATGKCTNGRCDC
TsTx-IV (α -12.1)	WCSTCLDLACGASRE-CYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYTN
Butantoxina	WCSTCLDLACGASRE-CYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYT
TsTx k β (β -1)	KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDDHC-NDIERKDGECHGFKCKCAKD

Figura 10 – Toxinas do veneno do *T. serrulatus* que agem em canais de potássio. As cisteínas estão em destaque.

4 – Os avanços na Soroterapia

São Paulo foi uma das primeiras cidades brasileiras a terem problemas com acidentes escorpiônicos. Sendo assim, os primeiros estudos sobre envenenamento por escorpiões no Brasil foram feitos no Instituto Butantan, por Vital-Brazil (1919). Alguns anos antes, Maurano (1915) imunizou o primeiro cavalo com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis*, o mais encontrado em São Paulo naquela época. Entretanto, ele obteve um soro com baixo poder antitóxico.

No ano de 1917, na filial do Instituto Oswaldo Cruz em Belo Horizonte, o Professor Eurico Vilela empregando uma metodologia semelhante à utilizada por Maurano desenvolveu o primeiro soro escorpiônico (Vilela, 1917). Este foi utilizado com sucesso pelo Dr. Octávio Magalhães em uma criança de 9 meses.

Como o escorpião *Tityus serrulatus* só foi descrito em 1922 por Mello Campos e Dr. Lutz, os soros produzidos em Belo Horizonte até então eram contra o *T. bahiensis*. Mas como o principal causador de acidentes nesta cidade era o escorpião amarelo (*T. serrulatus*), os soros passaram a ser feitos contra esta espécie.

No início da década de 90, o soro anti-escorpiônico para uso humano era produzido em apenas três instituições no mundo: Instituto Lister em Londres, Instituto Butantan em São Paulo e Instituto Oswaldo Cruz em Belo Horizonte (Hassan, 1984). Mas pesquisadores de vários países com problemas de escorpionismo estudaram e desenvolveram diversos soros (Hassan, 1984).

Hoje em dia, soros anti-escorpiônicos são produzidos rotineiramente por diversas instituições do mundo. Sendo que diferentes espécies de animais são usadas para a produção, tais como carneiros, cabras, camelos e cavalos, os mais comuns (Theakston e cols., 2003). No Brasil, o Instituto Butantan (São Paulo) e a Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte) são os principais fornecedores de soro anti-escorpiônico. O soro é produzido através da imunização de cavalos com veneno bruto obtido por estimulação elétrica da glândula (Barrio & Vital-Brazil, 1949).

Apesar do soro anti-escorpiônico ser eficaz, sua ação depende de sua qualidade e da rapidez com que é iniciado o tratamento (Maria e cols., 2005).

Além disso, a produção do soro para tratamento de picadas de escorpiões possui alguns problemas: 1) dificuldade em se obter o veneno que é a matéria prima para a produção do soro anti-escorpiônico; 2) alto custo de produção do soro, principalmente na manutenção dos cavalos utilizados para gerar o soro neutralizante. O tempo de vida desses animais é reduzido drasticamente devido à ação letal do veneno que é inoculado nos animais; 3) utilização de componentes do veneno que não estão ligados ao processo neutralizante, pois o que se utiliza é o veneno total e não frações específicas do veneno.

Sendo assim, pesquisadores de vários países discutem e estudam a possibilidade de se produzir um soro de melhor qualidade ou até mesmo uma vacina. Neste contexto, várias linhas experimentais estão sendo seguidas.

Estudos iniciais levaram os pesquisadores a estudar a possibilidade de usar frações tóxicas ou até mesmo toxinas para imunizar animais. Mas a alta toxicidade dessas moléculas dificulta o seu uso, sendo assim, vários métodos para tirar a toxicidade destas proteínas foram criados. Possani e cols. (1981) detoxificaram o veneno do *C. noxius* por polimerização com glutaraldéido. Neste mesmo ano, Delori e cols. (1981) retiraram a toxicidade da fração AaH G-50 do veneno do *A. australis* Hector por acetilação. Chavez-Olortegui e cols. (1991) capturam a fração tóxica do veneno do *T. serrulatus* (TstFG50) em lipossomas, abolindo sua toxicidade. Outros pesquisadores utilizaram métodos semelhantes com outras toxinas ou frações de venenos (Fonseca e cols., 1997; Kharrat e cols., 1997; Machado De Avila e cols., 2004). Em todos estes ensaios, verificou-se que as moléculas detoxificadas eram capazes de induzir a produção de anticorpos que neutralizavam os efeitos tóxicos dos venenos utilizados. Existem três principais problemas com essa abordagem: 1) a duração e efetividade da proteção eram limitadas; 2) dificuldade de se obter veneno suficiente para proteger todas as pessoas que necessitam; 3) alto custo (Gazarian e cols., 2005).

Com a facilidade de produzir peptídeos sintéticos, vários pesquisadores começaram a utilizá-los para definir epitopos antigênicos das toxinas de escorpião (Bahraoui e cols., 1986; El Ayeb e cols., 1986; Bahraoui e cols., 1988; Granier e cols., 1989). Assim, esses epitopos definidos eram sintetizados e usados para produzir anticorpos. Em muitos casos, esses anticorpos tinham a capacidade de neutralizar os efeitos dos venenos (Calderon-Aranda e cols.,

1995; Zenouaki e cols., 1997; Calderon-Aranda e cols., 1999; Alvarenga e cols., 2002; Chavez-Olortegui e cols., 2002).

Em 1996, uma nova possibilidade surgiu: Chavéz-Olórtegui e cols. descobriram uma proteína no veneno do escorpião *T. serrulatus* que não era tóxica para mamíferos e artrópodes, mas era capaz de produzir anticorpos que neutralizavam os efeitos do veneno total desse escorpião (Chavéz-Olórtegui e cols., 1996, 1997; Moreira-Ferreira e cols., 1998). Esta proteína foi chamada de “*Tityus serrulatus* non toxic protein”, TsNTxP. Somente recentemente, uma proteína com as mesmas características foi encontrada em um veneno de um escorpião de outro gênero, a Amm VIII no veneno do *Androctonus mauritanus mauritanus* (Alami e cols., 2003; Martin-Eauclaire e cols., 2006).

A possibilidade de produzir proteínas recombinantes utilizando a biologia molecular trouxe grandes avanços na soroterapia. Bouhaouala-Zahar e cols. (1996) clonaram uma toxina α do veneno do *Buthus occitanus tunetanus*, Bot XIV, que foi expressa em *E. coli* fusionada com dois domínios Z da proteína A de *S. aureus*. Essa proteína fusionada recombinante gerou anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar os componentes do veneno desse escorpião. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores (Legros e cols., 2002; Garcia e cols., 2003).

Com o advento da metodologia de “phage display” em 1988-1990, houve um estímulo pela busca de epitopos antigênicos de toxinas de escorpião utilizando essa metodologia. Anticorpos policlonais ou monoclonais foram usados para encontrar mimotopos em biblioteca de fagos com seqüências aleatórias de 7 a 12 resíduos. Mimotopos são peptídeos que mimetizam a especificidade antigênica e imunológica de epitopos naturais.

Recentemente, a seleção de mimotopos por anticorpos monoclonais foi usada para mapear epitopos de duas toxinas de *C. noxius*, NTX e Cn2, e peptídeos imunogênicos neutralizantes foram obtidos (Herion e cols., 1995; Gazarian e cols., 2000, 2003; Hernandez e cols., 2002).

Outra linha de pesquisa que vem gerando muitas informações é a produção de anticorpos monoclonais (mAbs) contra alguma toxina do veneno em estudo. Bahraoui e cols. (1988), selecionou dois mAbs que reconheciam a toxina AaH II com alta afinidade; um deles (4C1) é um ótimo anticorpo neutralizante tanto para a toxina quanto para o veneno bruto. Zamudio e cols.

(1992) produziram muitos monoclonais que reagem com Cn2, mas apenas um tinha capacidade neutralizante *in vivo* (BCF2). A partir de então outros mAbs neutralizantes foram selecionados: 23C6 contra AaH II (Devaux e cols., 1997), 9C2 contra AaH I e III (Clot-Faybesse e cols., 1999; Devaux e cols., 2002), BNTX 18 e 21 contra NTX (Hérion e cols., 1995), mAbTs1 contra fração tóxica do *T. serrulatus* (Alvarenga e cols., 2005).

Esse intenso estudo possibilitou a produção de fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes. O cDNA que codifica as regiões variáveis do mAb 4C1 (Mousli e cols., 1999) e do mAb 9C2 (Devaux e cols., 2001) foram isolados e manipulados para se produzir fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) recombinantes com alta capacidade neutralizante. Aubrey e cols. (2003) construíram um anticorpo scFv divalente (“diabody”) utilizando a seqüência de nucleotídeos do mAb 9C2 que possuía estabilidade e atividade protetora. O Fab recombinante foi outra construção que teve sucesso (Aubrey e cols., 2004; Selisko e cols., 2004). Uma vez que monoclonais murinos tem um baixo valor terapêutico (risco de gerar uma reação de hipersensibilidade) e monoclonais humanos são difíceis de produzir, devido à instabilidade de linhagens celulares de hibridomas humanos (Mousli e cols., 1999; Devaux e cols., 2001; Gazarian e cols., 2005), estas novas moléculas são candidatas promissoras para a produção de uma nova geração de antivenenos.

Ainda assim, as informações obtidas até agora são insuficientes para gerar um quadro compreensivo sobre este assunto e propor soros alternativos e vacinas contra venenos de escorpião.

Objetivo Geral

Busca e produção de novos imunógenos recombinantes para produção de soro anti-*Tityus serrulatus* e estudo da potência dos soros obtidos.

Objetivos Específicos

- Buscar seqüências de toxinas do veneno na biblioteca de cDNA da glândula do *Tityus serrulatus* que possam ser usadas para produção de soro e ampliação do banco de dados de toxinas do laboratório;
- Produzir cassetes de expressão com as toxinas TsTx e TsTx-I e a proteína TsNTxP;
- Produzir proteínas recombinantes em tandem da toxina TsVII;
- Imunizar coelhos e camundongos com as proteínas recombinantes produzidas;
- Testar a potência dos soros obtidos;
- Verificar a proteção (*in vivo*) obtida pela imunização com as proteínas recombinantes.

Justificativa

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

A descoberta da TsNTxP deu um grande impulso em nossas pesquisas. Inicialmente, estudamos os efeitos da proteína nativa, mas sua obtenção possui alguns problemas, tais como: conseguir quantidade suficiente de veneno para sua purificação e as várias purificações necessárias para se obter à proteína pura, uma vez que ela representa menos que 1% do veneno total. Esses fatores em conjunto tornam inviável a utilização da TsNTxP nativa para a produção de um soro de uso comercial.

Sendo assim, foi feita uma busca do cDNA da TsNTxP em uma biblioteca de cDNA de *T. serrulatus* construída a partir da glândula do veneno deste escorpião (Guatimosim e cols., 1999). Uma vez clonada, essa proteína foi expressa em grandes quantidades em bactérias e o seu poder neutralizante testado (Guatimosim e cols., 2000); o soro obtido (100 µl) era capaz de neutralizar até 3DL₅₀.

Em paralelo, estudos com peptídeos sintéticos determinaram alguns epitopos das toxinas de escorpião e da TsNTxP que eram reconhecidos por soros anti-TsNTxP, anti-TsIV e anti-veneno total de *Tityus serrulatus* (Chavéz-Olortegui e cols., 2002; Alvarenga e cols., 2002; Mendes e cols., 2004; Maria e cols., 2005). Alguns desses epitopos foram sintetizados e a capacidade de produção de soro neutralizante foi testada, entretanto o soro obtido protegia 95% dos animais inoculados com apenas 1DL₅₀ e 58% com 2DL₅₀.

Mendes e cols. (2004) produziram a TsNTxP em bactérias *E. coli* como proteína de fusão. A proteína recombinante foi utilizada para imunizar carneiro, coelho e camundongos. O poder neutralizante dos soros e sua reatividade frente a peptídeos sintéticos da TsNTxP foram testados. Verificamos que os animais respondiam de maneira diferente a quantidades proporcionais de proteína. Apesar do soro do carneiro e do coelho reagirem com epitopos semelhantes, o soro do carneiro conferiu o dobro de proteção do que o do coelho. E o soro dos camundongos que reagiu com um menor número de epitopos (seqüências lineares de regiões específicas da proteína TsNTxP) apresentou uma proteção intermediária, menor que o soro do carneiro e maior

que o soro do coelho. Nesses experimentos utilizamos 2DL₅₀ do veneno do *T. serrulatus*.

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

Como a utilização de toxinas nativas é inviável para produção em larga escala de soro anti-escorpiônico, nós decidimos utilizar proteínas recombinantes expressas em sistemas procariotos para obtermos novos imunógenos a serem testados. O sistema procarioto foi o escolhido por ser o mais simples, mais barato e com mais ferramentas disponíveis. O problema de usar este tipo de sistema para expressar proteínas de baixo peso molecular como as toxinas é que estas proteínas são facilmente degradadas no citoplasma das células bacterianas. Para aumentar a estabilidade de pequenas proteínas expressas em bactérias foi desenvolvida uma estratégia que permitia a expressão de vários genes em série (em tandem) da mesma proteína, aumentando assim o produto a ser expresso (Gigova e cols., 1989; Ishikawa & Tamaoki, 1996). Desta estratégia surgiu a idéia de produzir proteínas quiméricas para desenvolvimento de vacinas e soros (Bharaduraj e cols., 1998; Soto e cols., 1998; Molano e cols., 2003). Para tal um DNA recombinante que contivesse fragmentos de DNA codificante para diferentes regiões antigênicas era construído e expresso.

Portanto, nosso intuito foi a utilização destas duas estratégias (proteínas em tandem e quiméricas) para produzir proteínas recombinantes mais estáveis no citoplasma de bactérias e com uma capacidade de gerar anticorpos com um grande poder de neutralizar o veneno do *Tityus serrulatus*. Para a construção das proteínas recombinantes utilizamos a seqüência de nucleotídeos das principais toxinas do veneno (TsTx e TsTx-I) e da proteína TsNTxP.

Materiais e Métodos

A – Reagentes, Meios de Cultura, Soluções

Meios de Cultura

Lb-caldo: 10 g de NaCl; 10 g de bactotripton e 5 g de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e o volume para 1 litro. O meio foi autoclavado.

Lb-ágar: 10 g de NaCl; 10 g de bactotripton e 5 g de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e o volume para 1 litro. Este meio foi acrescido ágar na concentração final de 1,5% para cultura em meio sólido. O meio foi autoclavado.

2xYT-caldo: 16 g de extrato de levedura, 10 g de bactotripton, 5 g de NaCl para 1 litro de água destilada. Autoclavar.

SOC-caldo: 10 g de bactotripton (2%), 2,5 g de extrato de levedura (0,5%), 0,3 g de NaCl (10 mM), 0,093 g de KCl (2,5%), 1,07 g de $MgCl_2$ (10 mM), 0,6 g de $MgSO_4$ (10 mM), 1,8 g de glicose (20 mM), foi acrescentado água para volume final de 500 mL. O meio foi autoclavado.

NZY-caldo 5x: 25 g de NaCl, 10 g de sulfato de magnésio, 25 g de extrato de levedura, 50 g de caseína hidrolisada, adicionar água deionizada e acertar o pH para 7, 5. Autoclavar.

NZY-caldo: Diluir 5x o meio concentrado. Para 1 L usar 200 mL do NZY 5x. Autoclavar.

NZY-Agar: Fazer o NZY-caldo e acrescentar 15 g de ágar para cada 1 litro. Autoclavar.

NZY-Top Agar: Prepare 1 L de meio NZY e adicionar 0,7% (peso/volume) de agarose. Autoclavar.

Antibióticos

Ampicilina: Ampicilina (MERCK) foi dissolvida em H₂O estéril na concentração de 100 mg/mL, filtrada (filtro 0,22 µm) e estocada a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 100 µg/mL.

Canamicina: Canamicina (MERCK) foi dissolvida em H₂O estéril na concentração de 50 mg/mL, filtrada (filtro 0,22 µm) e estocada a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 50 µg/mL.

Clorofenicol: Clorofenicol (MERCK) foi dissolvido em H₂O estéril na concentração de 30 mg/mL, filtrada (filtro 0,22 µm) e estocada a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 30 µg/mL.

Tetraciclina: Tetraciclina (MERCK) foi dissolvida em H₂O estéril na concentração de 12,5 mg/mL, filtrada (filtro 0,22 µm) e estocada a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 12,5 µg/mL.

Soluções de Extração de DNA Genômico

TEN 9: 50 mM de Tris pH 9,0, 100 mM de EDTA pH 8,0, 200 mM de NaCl

TE: 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0

RNase: Diluir em água destilada a RNase A livre de DNase (Invitrogen) para concentração final de 100 µg/mL.

Proteinase K: Fazer uma solução estoque em água destilada na concentração de 250 mg/ml. Estocar no freezer e usar ela na concentração final de 10 mg/mL.

SDS 20%: Pesar 20g de SDS e acrescentar água destilada para um volume final de 100 mL.

Acetato de Amônia 10 M: Pesar 77,08 g de acetato de amônia e acrescentar água destilada para um volume final de 100 mL.

SM Buffer: 5,8 g de NaCl, 2 g de sulfato de magnésio, 50 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5, 5 mL de 2% de gelatina (peso/volume), acrescentar água deionizada para volume final de 1 mL. Autoclavar.

Soluções para Purificação com Sílica/Guanidina

Tiocianato de Guanidina 6 M: Pesar 120 g de tiocianato de guanidina para 100 mL de Tris 10 mM pH 6,4.

Etanol em Tris: Medir 20 mL de Tris 10 mM pH 6,4 e completar para 100 mL com etanol absoluto.

Tris 10 mM pH 6,4: Pesar 1,21 g de Tris base e acrescentar 800 mL água destilada, acertar o pH com HCl para 6,4. Completar o volume para 1 L.

Tris 10 mM pH 8,0: Pesar 1,21 g de Tris base e acrescentar 800 mL água destilada, acertar o pH com HCl para 8,0. Completar o volume para 1 L.

Soluções para fazer Bactérias quimiocompetentes

Tfb I: 30 mM acetato de potássio, 50 mM de $MnCl_2$, 100 mM de KCl, 10 mM de $CaCl_2$, 15% de glicerol, pH 5,8

Tfb II: 10 mM de Na-MOPS, 75 mM de $CaCl_2$, 10 mM de KCl, 15% de glicerol, pH 7,0

Soluções para fazer Bactérias eletrocompetentes

Glicerol 10%: Diluir 100 mL de glicerol em água destilada para volume final de 1 L. Autoclavar.

Soluções para Mini-Prep

Solução I: 50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0

Solução II: 0,2 N de NaOH e 1% de SDS.

Solução III: 60 mL de uma solução de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água destilada.

Soluções para fazer Gel de Agarose

Agarose: A agarose foi dissolvida por aquecimento, em TAE 1x de acordo com a porcentagem de gel a ser preparado.

Brometo de etídio: Brometo de etídio foi dissolvido em água na concentração de 10 mg/mL, sendo a solução estocada em um recipiente escuro. Importante: usar luvas e máscara – substância mutagênica e teratogênica.

TAE: Tampão Tris-acetato-EDTA (solução estoque 50x): 242 g de Tris base, 57,1 mL de ácido acético e 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0. Usar o tampão 1x.

Soluções para Expressão e Lise Bacteriana

IPTG (Isopropiltio- β -D-galactose): O IPTG foi dissolvido em água mili-Q estéril na concentração de 600 mM, filtrado (filtro 0,22 μ m) e estocada a -20°C .

Tampão de lise: 50 mM de Tris, 1mM EDTA, 50 mM de glicose pH8,0

Lisozima: Pesar 4 mg de lisozima para 1 mL de tampão de lise. Fazer a solução na hora do uso.

Glicose: 20 g de D-glicose foram dissolvidas em 100 mL de água (solução 20%). A solução foi esterilizada por filtração (filtro 0,22 μm) e estocada a 4°C.

Soluções para Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford

Reagente de Bradford: 10 mg de coomassie brilliant blue G-250, 5 mL de etanol 95%, 10 mL de ácido fosfórico 85%, acrescentar água destilada para volume final de 100 mL. Dissolver o corante em etanol, acrescentar 60 mL de água e logo depois adicionar lentamente o ácido. Completar o volume com água para 100 mL e filtrar em papel de filtro comum. Armazenar a 4°C por aproximadamente um mês.

BSA: Pesar 1 mg de soro albumina bovina e diluir em água destilada para volume final de 1 mL. Estocar a -20°C.

Soluções para fazer Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

Tampão de amostra 2x: 2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1,6 mL de glicerol; 3,2 mL de SDS 10%; 0,8 mL de β -mercaptoetanol; 500 mg de bromofenol blue e ajustar o volume para 8 mL com água destilada e o pH foi acertado para 8,3.

Solução A de gel: 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida, água q.s.p 100 mL.

Solução B de gel: 18,15 g de Tris, acertar o pH com HCl para 8,8, água q.s.p. 100 mL.

Solução C de gel: 6,0 g de Tris, água q.s.p. 100 mL, acertar o pH com HCl para 6,8, água q.s.p. 100 mL.

Solução D de gel: SDS 10% (10 g de SDS para 100 mL de solução).

Tampão de corrida 5x: 1,5% de Tris-Base, 7,2% de glicina e 0,5% de SDS.

Solução corante: 1,25 g de Comassie blue, 225 mL de metanol, 45 mL de ácido acético glacial e 225 mL de água.

Solução descorante: 45 mL de etanol, 90 mL de ácido acético glacial e 850 mL de água.

Solução para secar gel de poliacrilamida: 25% de etanol e 1,5% de glicerol.

Soluções de Western Blot

Tampão de transferência para Western blot: 14,42 g/l de glicina, 3,03 g/l de Tris e 200 mL/l de metanol. O pH deve estar em torno de 8,3.

Solução de PBST 0,3% para Western blot: PBS 1x, 0,3% de Tween 20.

Solução de PBST 0,05% para Western blot: PBS 1x, 0,05% de Tween 20.

Solução reveladora para Western blot: 10 mg de DAB + 10 mL PBST 0,05%, 5 mg de cloronaftol + 1,7 mL de metanol + 8,3 mL de PBST 0,05%, 10 µl de H₂O₂.

Soluções de ELISA

PBS 10x – Tampão fosfato salina (pH 7.4): Preparar 500 mL de uma solução 0,5 M de Na₂HPO₄ e 200 mL de uma solução 0,5 M de NaH₂PO₄. O pH da solução de Na₂HPO₄ foi acertado para 7.4 usando a solução de NaH₂PO₄. Medir o volume final e acrescentar para cada 100 mL de solução 9 g de NaCl. A solução é então filtrada e estocada a 4°C.

Tampão Carbonato: 15 mM de Na₂CO₃, 35 mM de NaHCO₃, pH da solução 9,6.

Tampão Citrato: 50 mM de Na₂HPO₄, 24 mM de ácido cítrico, pH da solução 5,0.

Tampão de Bloqueio: 2% caseína em PBS 1x.

Tampão de Incubação: 0,2% de caseína em PBS 1x e 0,05% de Tween 20.

Solução de Lavagem: 0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20.

Solução reveladora de ELISA: 10 mL de tampão citrato, 2 mg de OPD, 2 μ l de água oxigenada 30%.

Outras Soluções

CIAP stop buffer: 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 mM de EDTA pH 7,5, 200 mM de NaCl, 0,5% de SDS

Sulfato de Magnésio 1M: 24,65 g de sulfato de magnésio para um litro de água deionizada.

Maltose 20%: 20 g de maltose para 100 mL de água de deionizada. Filtrar com filtro de 0,22 μ m.

B – Genótipo das linhagens de bactéria utilizadas

Linhagem XL1 Blue: Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^R)].

Linhagem XLOR: Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^R)] Su⁻ (não suprimido) λ^+ .

Linhagem DH 5 α : ϕ 80dlacZ σ M15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 relA1 deoR σ (lacZYA-argF) U169

Linhagem Topo 10 F': F' {lacI^q Tn10 (Tet^R) mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC). ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

Linhagem BL21: dcm ampT hsd(r_B-m_B-)gsl Lon⁻

Linhagem Origami: Δ(ara-leu) 7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvu II phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lacI^q pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysS (Cam^R, Str^R, Tet^R).

C – Animais Utilizados

Camundongos Swiss CF1 pesando entre 18 e 22 g foram obtidos no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais. Coelhos Nova Zelândia pesando aproximadamente 2 Kg foram obtidos na Fazenda da Escola de Medicina Veterinária/UFMG. Os coelhos e camundongos foram mantidos no biotério da Escola de Medicina Veterinária. Todos os animais receberam água e alimentação em condições controladas.

D - Preparo do estoque de bactérias

Todos os clones obtidos neste trabalho foram preparados para serem estocados e guardados a -80 °C, como descrito abaixo.

Células de bactérias BL21DE3 ou DH 5α foram transformadas com os clones de interesse e plaqueadas em meio sólido LB-ágar com 100 µl/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por 16 horas. Foi então retirada uma colônia da placa e adicionada ao meio líquido LB-ampicilina. Essa mistura foi crescida a 37°C sob agitação. Após atingir a fase log tardia, foi feita uma mistura de glicerol e cultura de bactérias atingindo uma concentração de 30% de glicerol. Alíquotas foram armazenadas em tubos estéreis a -80°C.

E – Metodologia

Estratégia geral do trabalho

As etapas da metodologia utilizada estão resumidas no esquema abaixo.

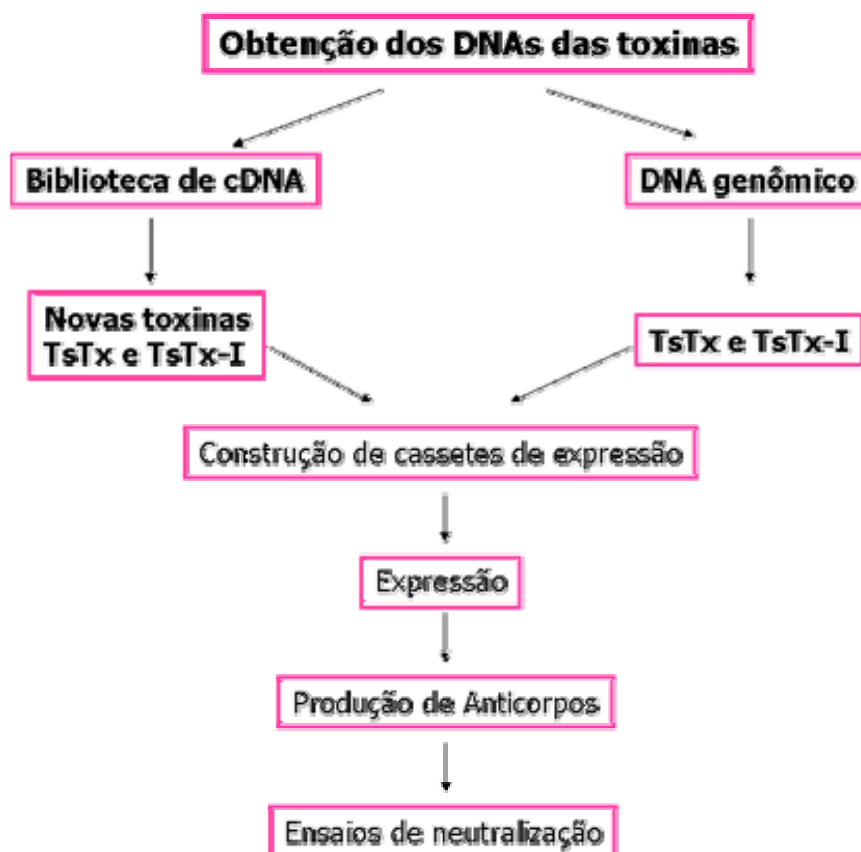


Figura 11 – Esquema da metodologia utilizada.

Nas etapas que clonagem e montagem dos cassetes de expressão seguimos sempre uma série de procedimentos que estão descritos no esquema abaixo. A inserção do DNA inicialmente em vetores de fácil clonagem foi uma estratégia utilizada para facilitar a subclonagem nos vetores pBluescript e pET. Os vetores de fácil clonagem utilizados foram o pGEM e o TOPO TA (Figura 13).

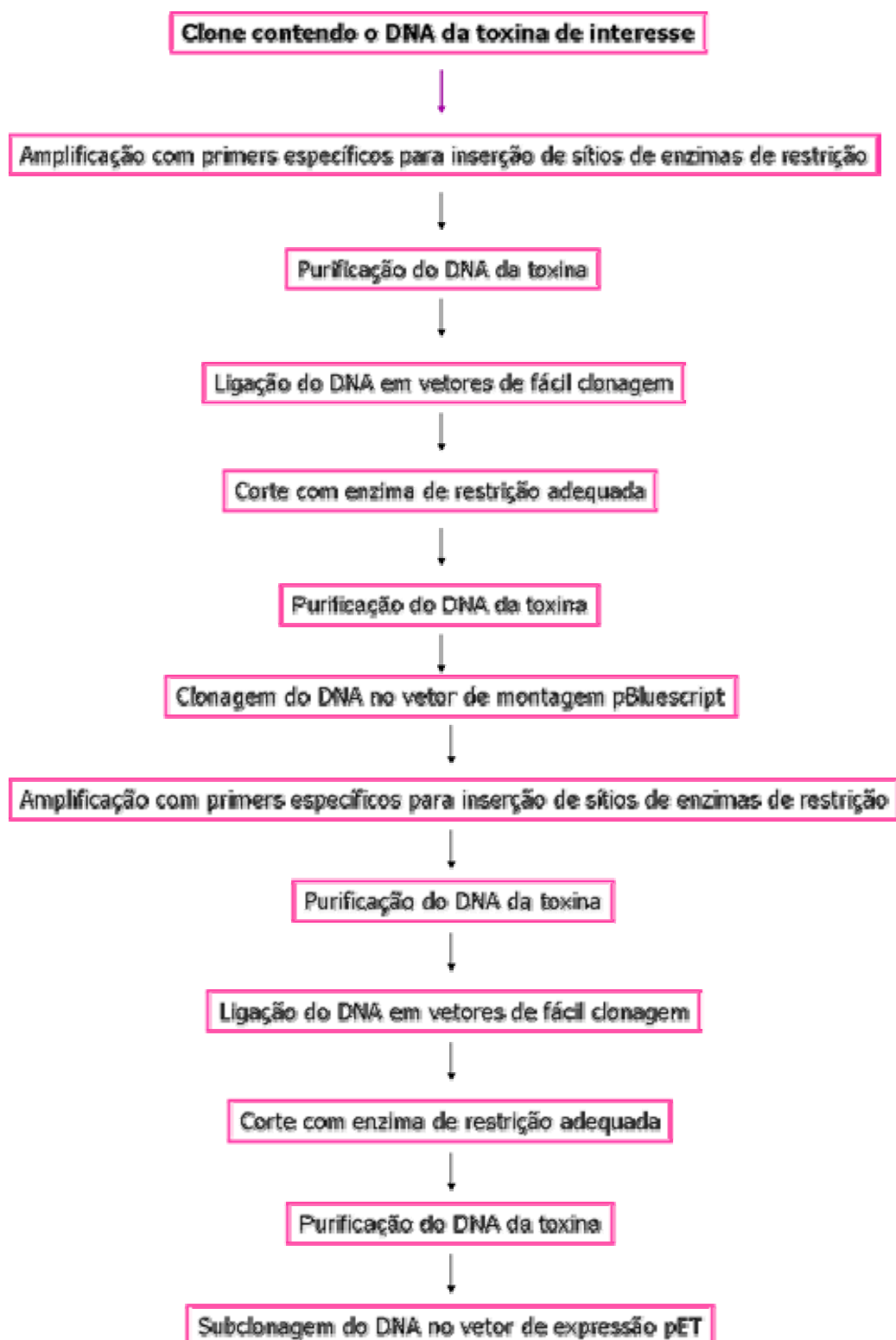
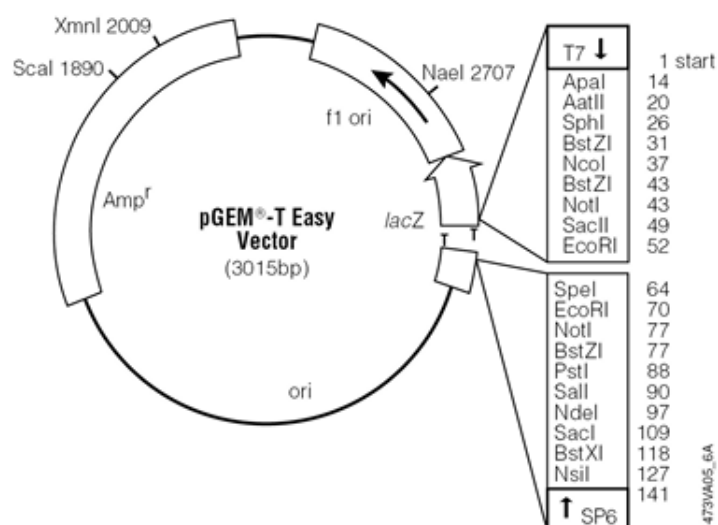


Figura 12 – Procedimentos utilizados nas etapas de clonagem.

A.



B.

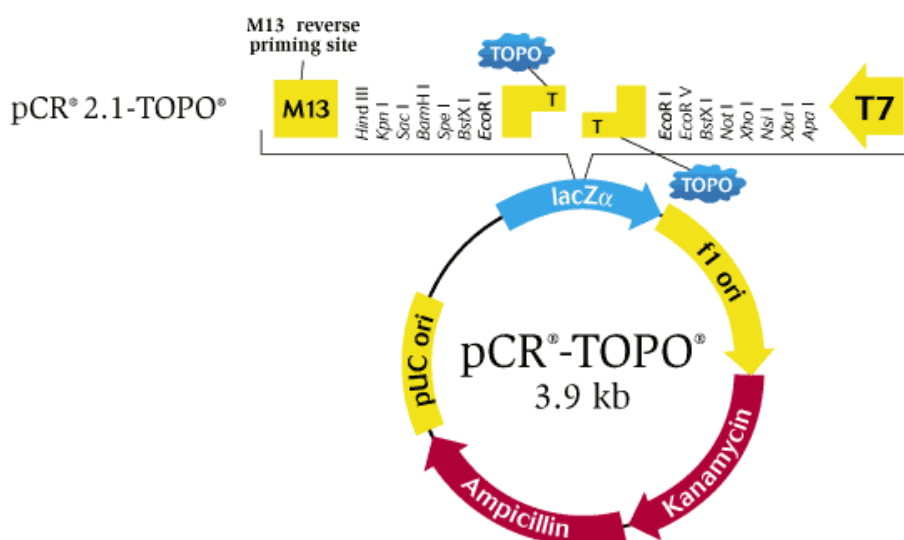


Figura 13 – Vetores de fácil clonagem. Em A, o vetor pGEM T Easy e em B, o vetor TOPO TA. Em ambas as figuras, o sítio múltiplo de clonagem está em destaque.

Foram construídos vários cassetes de expressão, objetivando a construção de novos sistemas de expressão (plasmídios ainda não testados no nosso laboratório com toxinas de escorpião) e construções quiméricas com DNA de duas ou mais toxinas e em tandem com mais de uma cópia de DNA de uma mesma toxina (Figuras 16 e 17).

I - Obtenção do DNA das toxinas

A obtenção do DNA das toxinas utilizadas neste trabalho foi feita utilizando duas metodologias: através do DNA genômico para as toxinas que tem sequência de nucleotídeos já determinada e através da biblioteca de cDNA da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus* para obter novas toxinas e proteínas.

1 - Obtenção do DNA de toxinas a partir do DNA genômico do escorpião *Tityus serrulatus*

Para o desenvolvimento de etapas deste trabalho era necessário as sequências de nucleotídeos da TsNTxP, da TsTx e da TsTx-I.

A sequência de nucleotídeos da TsNTxP já foi descrita por Guatimosim e cols. (1999). E no meu trabalho de mestrado ela foi clonada em um plasmídeo de expressão, o pMAL p2. Este clone foi utilizado para amplificação do DNA da TsNTxP. Novos primers foram feitos para inserção do sítio de restrição da Xho I ao DNA da TsNTxP, para sua posterior clonagem no pBluescript (Figura 14).

Já as sequências da TsTx e da TsTx-I, como anteriormente foram descritas (Martin-Eauclaire e cols., 1992; 1994) e depositadas no banco de dados do NCBI, poderiam ser amplificadas a partir do DNA genômico do *T. serrulatus*. Para isso foram construídos primers com os sítios de restrição adequados para cada montagem (Figura 14).

Primers da TsNTxP

Senso

5' CTC GAG GGT AGA GAA GGT TAT CCA G 3'
 GGT AGA GAA GGT TAT CCA GCG GAT TCC AAG GGT TGC AAA
 ATT ACT TGT TTT CTT ACA GCT GCA GGA TAC TGC AAT ACA GAA TGC ACA
 CTC AAA AAG GGA TCA TCG GGT TAT TGC GCC TGG CCG GCG TGT TAC TGC
 TAC GGG CTT CCA GAT TCA GTG AAA ATT TGG ACT AGT GAA ACG AAT AAA
 TGT GGC
 CC TGA TCA CTT TGC TTA TTT ACA CCG
GAG CTC

5' CTC GAG GCC ACA TTT ATT CGT TTC ACT AGT CC 3'

Anti-senso

Primers da TsTx

Senso

5' GTC GAC AAG AAA GAC GGA TAC CCG 3'
 AAG AAA GAC GGA TAC CCG GTG GAA TAC GAT AAC TGC GCC
 TAC ATT TGC TGG AAC TAC GAC AAC GCT TAC TGC GAT AAG CTG TGC AAA
 GAC AAG AAA GCC GAT AGC GGA TAT TGT TAC TGG GTT CAC ATC CTG TGC
 TAC TGC TAC GGG CTT CCC GAT AGC GAA CCG ACC AAG ACC AAC GGA AAA
 TGC AAA TCC
 GG TTG CCT TTT
 ACG TTT AGG CAG CTG

5' GTC GAC GGA TTT GCA TTT TCC GTT GG 3'

Anti-senso

Primers da TsTx-I

Senso

5' AAG CTT AAA GAA GGT TAT CTC ATG 3'
 AAA GAA GGT TAT CTC ATG GAT CAC GAA GGT TGC AAA CTT
 AGT TGC TTT ATC AGA CCA TCG GGA TAC TGC GGC AGA GAA TGC GGA ATT
 AAA AAG GGC TCA TCG GGC TAT TGC GCC TGG CCC GCG TGT TAC TGC TAC
 GGG CTT CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAT AGA GCG ACG AAC AAA TGT
 C CTA TCT CGC TGC TTG TTT ACA
TTC GAA

5' AAG CTT ACA TTT GTT CGT CGC TCT ATC C 3'

Anti-senso

Figura 14 – Primers construídos para clonagem das proteínas de interesse. Os sítios de restrição estão sublinhados. Para TsNTxP, Xho I, para TsTx, Sal I e para TsTx-I, Hind III.

1.1 - Extração de DNA genômico do escorpião *Tityus serrulatus*

O escorpião foi colocado no gelo seco e macerado em um gral com gelo seco até virar pó. Este foi recolhido com uma espátula e colocado em um tubo de 50 mL. Foram adicionados 10 mL de TEN 9 e 50 µl de RNase (100 mg/mL). A mistura foi homogeneizada e agitada por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 250 µl de SDS 20%, e a mistura foi agitada por mais 10 minutos. Proteinase K (10 mg/mL) na mesma quantidade de SDS foi adicionada e a solução foi agitada por 16 horas a 37°C. No outro dia, um volume de fenol:clorofórmio (1:1) foi adicionado e misturado por 1 hora. Foi feita uma centrifugação 5 minutos a 5000g, à parte superior foi retirada e passada para outro tubo. Um volume de clorofórmio foi acrescentado e agitado por 10 minutos. Foi feita uma centrifugação novamente (5 minutos a 5000g) e a parte de cima (fase aquosa que contém o DNA) foi guardada. A esta, foi acrescentado 1/5 do volume de acetato de amônia 10 M e 1 volume de isopropanol. O tubo foi invertido, deve-se observar a formação de um precipitado filamentosos. O DNA foi recolhido com uma pipeta Pasteur com a ponta selada e mergulhado em 5 mL de etanol 70% para lavar o DNA. Este foi passado para outro tubo e deixado secar totalmente. O DNA seco foi ressuspensionado em 1 mL de TE contendo 2 µl de RNase (20 µg/mL) e deixado 16 horas a 37°C. No outro dia um gel de agarose 1% foi corrido para quantificar o DNA genômico obtido.

1.2 - Padronização da PCR e Amplificação dos DNAs das toxinas

Testes foram feitos para padronizar a quantidade de DNA genômico a ser usada na PCR. As reações de amplificação por PCR foram realizadas como descrito por Saiki e cols., (1988) utilizando a enzima Taq DNA polimerase (PHT). Os primers utilizados estão mostrados na Figura 14. A reação de PCR foi montada da seguinte maneira:

Reação 1

Material	Quantidade
Primer Senso (20 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer anti-senso (20 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Taq PHT(1 μ l/5U)	0,2 μ l
DNA genômico diluído	2 μ l
dNTP (1 mM)	2,5 μ L
Tampão 1B ou 1C PHT (10x)	2,5 μ l
Água deionizada estéril	16,8 μ l
Vol. Final	25 μ l

Programa 1

- 1- 94 °C por 3 minutos (desnaturação);
- 2- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 3- 55 °C por 1 minuto (anelamento);
- 4- 72 °C por 1 minuto (extensão);
- 5- Repetir o ciclo 5 vezes a partir da etapa 2;
- 6- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 7- 50 °C por 1 minuto (anelamento);
- 8- 72 °C por 1 minuto (extensão);
- 9- Repetir o ciclo 30 vezes a partir da etapa 6;
- 10- 72 °C por 5 minutos ;
- 11- 4 °C por tempo indefinido.

O DNA genômico foi diluído 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50 e foram utilizados 2 μ l. Os tampões IB e IC (PHT) para a Taq polimerase também foram testados.

1.3 - Clonagem dos DNAs no vetor pGEM T Easy vetor

1.3.1- Purificação de DNA pelo método da Sílica/Guanidina

O DNA das toxinas foi amplificado de 2 µl de DNA genômico diluído 1:50, sendo que foram feitas 20 reações para cada. Tampão de amostra *Loading Buffer* foi adicionado às amostras de DNA amplificado. Este material foi então submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%.

O pedaço de gel contendo a banda de interesse foi cortado e triturado em um tubo Falcon de 15 mL. Ao gel triturado foram acrescentados 2 volumes de Tiocianato de Guanidina 6 M em Tris-HCl 10 mM pH 6,4. Se a cor não estiver amarela, devem ser acrescentadas algumas gotas de acetato de sódio 3 M pH 5,2. O tubo foi deixado no banho a 70°C por 10 minutos ou até o gel derreter. Foram adicionados 50 µl de sílica e o tubo deixado no banho a 70°C por mais 10 minutos. Foi feita uma centrifugação à 3000g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de Etanol 80% em Tris-HCl 50 mM pH 6,4, ressuspensando o pellet. Foi feita uma centrifugação à 5000g por 2 minutos e o procedimento acima foi repetido mais duas vezes. O pellet foi seco no banho a 56°C por 30 minutos. Foram adicionados 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, o pellet foi ressuspensado e a solução resultante foi deixada no banho a 56°C por 30 minutos. Foi feita uma centrifugação a 2000 g por 2 minutos e o sobrenadante foi guardado. Os 2 últimos passos foram repetidos 2 vezes.

Após purificação, 2 µl dos sobrenadantes obtidos foram aplicados em gel de agarose 1%.

1.3.2 – Ligação dos DNAs da TsTx-I e TsTx em pGEM

As ligações em vetor pGEM foram realizadas de acordo com fabricante (Promega®). A tabela abaixo mostra as quantidades que foram utilizadas.

Material	Quantidade
Vetor pGEM	1 µl
Produto de PCR	0,5/1,0/1,5/2,0 µl
T4 DNA Ligase (3 U/µl)	1 µl
Tampão de ligação 2x	5 µl
Água deionizada	2,5/2,0/1,5/1,0 µl
Volume final	10 µl

A reação foi homogeneizada e deixada incubando por 16 horas a 4°C. Após esse tempo, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 96%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 g durante 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e depois de seco, ressuspendido em 4 µl de água deionizada e mantido a 4°C.

1.4 – Eletroporação

1.4.1 - Bactérias eletrocompetentes

Bactérias da linhagem Topo 10 F foram estriadas em uma placa LB/Kanamicina. Uma colônia isolada foi crescida em 5 mL de meio LB em frasco de 50 mL por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm.

A pré-cultura foi inoculada em 500 mL de meio LB e crescida até OD₆₀₀ = 0,5-0,7. A cultura foi transferida para tubos próprios de centrifuga gelados e foram mantidos no gelo por 20 minutos.

Foi feita uma centrifugação das células a 4000g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e então a massa de células foi ressuspendida suavemente com 500 mL de glicerol 10% estéril e gelado.

Foi feita uma nova centrifugação, sobrenadante foi descartado e a massa de células foi ressuspensa suavemente com 250 mL de glicerol 10% estéril e gelado.

Os procedimentos de centrifugação foram repetidos e então a massa de células foi ressuspensa suavemente com 20 mL de glicerol 10% gelado e estéril.

Mais uma vez, os passos foram repetidos e a massa de células foi ressuspensa suavemente com 1 a 2 mL de glicerol 10% gelado e estéril.

A DO_{600} das células diluídas foi determinado (o valor deve ser de 0,15 se necessário diluir a amostra). As células diluídas foram aliquoteadas e congeladas rapidamente em gelo seco/etanol. As células foram estocadas em freezer -80°C .

1.4.2 – Protocolo de Eletroporação

As bactérias competentes foram descongeladas no gelo. O produto de ligação (2 μl) a ser transformado foi incubado com 40 μl de células competentes no gelo por 5 minutos.

Na eletroporação, foram utilizados os seguintes parâmetros: choque de 1,8V, corrente de 25 μF , e com resistência de 200 Ohms. O tempo de choque é de 4,4 ms.

Após o choque foi adicionado 1 mL de meio SOC estéril e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora. Foram plaqueadas em 3 placas (contendo antibiótico) com meio LB agar, 100-200 μl de suspensão de bactérias por placa. A incubação foi a 37°C por 16 horas.

Como controle foram feitos os mesmos procedimentos com bactérias sem plasmídeo e plaqueadas 100 μl de células em uma placa com antibiótico e em outra sem antibiótico.

1.5 – PCR de Colônia

Após a eletroporação do produto da ligação e crescimento das bactérias, foram selecionadas 20 colônias.

A reação de PCR foi preparada da seguinte maneira:

Reação 2

Material	Quantidade
Primer Senso (20 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer anti-senso (20 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Taq (1 μ l/5U) (PHT)	0,2 μ l
DNA	-
dNTP (1 mM)	2,5 μ L
Tampão 1C (10x) (PHT)	2,5 μ l
Água deionizada estéril	18,8 μ l
Vol. Final	25 μ l

O programa utilizado para a PCR de colônia foi o mesmo descrito no item I-1.2.

Em um fluxo laminar, 100 μ l de meio LB contendo antibiótico (100 μ g/mL) foram adicionados em cada poço de uma placa de cultura (96 wells). Uma ponteira foi encostada em uma colônia de bactéria e em seguida lavada em um poço da placa com meio. Todo meio de cultura foi retirado do interior da ponteira e então esta foi lavada novamente em um tubo contendo a reação da PCR. Este procedimento foi repetido para as demais colônias. Após a reação de PCR a amplificação foi verificada em gel de agarose a 1%. As colônias positivas tiveram seus plasmídeos extraídos.

1.6 – Purificação de plasmídeo por lise alcalina

Extração de plasmídeo de *E. coli* foi realizada segundo o método de lise alcalina-SDS (Sambrook e cols., 1989). Segue o protocolo utilizado:

Uma colônia isolada foi colocada para crescer em 10 mL de meio LB broth com ampicilina (100 µg/mL), em um agitador a 180 rpm e à temperatura de 37°C, durante 16 horas, em tubo de 50 mL.

Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos e centrifugada a 3000g por 10 minutos, a 4°C. Todo o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de solução I gelada, transferido para um tubo de 1,5 mL e deixado por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 300 µL de solução II, preparada na hora do uso, o conteúdo foi misturado cuidadosamente por inversão e deixado por 5 minutos no gelo. Foram adicionados 30 µL de solução III e a mistura foi homogeneizada novamente por inversão. O tubo foi deixado no gelo por mais 5 minutos e centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e foram adicionados ao sobrenadante 0,6 volumes de isopropanol 100%. O tubo foi deixado em repouso por 12 minutos e centrifugado novamente (12000g por 10 minutos, à temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Depois que o precipitado secou foi dissolvido em um volume de 50 µL de TE pH 8,0 com RNase (20 µg/mL). O tubo foi deixado 1 hora a 37°C para a enzima agir. Um gel de agarose 1% foi corrido para quantificar os plasmídeos purificados.

1.7 - Corte com enzimas de restrição

Os plasmídeos obtidos foram cortados com as enzimas apropriadas. Os clones da TsTx-I foram cortados com a enzima Hind III, os clones da TsTx foram cortados com a enzima Sal I.

A digestão dos plasmídeos foi realizada da seguinte maneira:

Material	Quantidades
Vetor	1 µg
Enzima	2,5 U
BSA 100 µg/mL (quando necessário)	2 µl
Tampão (10x)	2 µl
Água deionizada estéril	Variável
Volume final	10 µl

A reação foi deixada por 1 hora a 37°C e depois um gel de agarose 1% foi corrido para verificar se houve digestão.

1.8 – Seqüenciamento

Os seqüenciamentos dos plasmídeos quantificados foram realizados no aparelho *MegaBACE DNA sequencer* no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da UFMG. A reação de seqüenciamento foi feita utilizando-se o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham).

Primers utilizados:

M13 anti-senso: GGAAACAGCTATGACCATG

M13-20: TGACCGGCAGCAAAATG

Reação de seqüenciamento:

Material	Quantidade
ET kit	4 µl
Primer (5 pmol/µl)	1 µl
DNA molde	200 ng
Água qsp	10 µl
Volume final	10 µl

Programa 2

- 1- 95 °C por 20 segundos (desnaturação);
- 2- 55 °C por 15 segundos (anelamento);
- 3- 60 °C por 1 minuto e 20 segundos (extensão);
- 4- Repetir o ciclo 29 vezes a partir da etapa 1;
- 5- 4 °C por tempo indefinido

1.9 - Análise computacionais das seqüências obtidas

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas através do programa “Basic Local Alingment Search tool prograrm for amino acids” – Blast – Gen Bank (Altschul & Lipman, 1990) – www.ncbi.nlm.nih.gov).

2 - Busca de DNAs de toxinas na biblioteca de cDNA da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

2.1 - Biblioteca de DNA da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

Essa biblioteca foi construída pelo Professor Evanguedes Kalapothakis a partir da extração total dos RNAs da glândula de veneno e da purificação dos mRNAs em coluna oligo-dT. Essas moléculas foram usadas como moldes para a síntese do DNA, usando o *Zap DNA Synthesis Kit* (Stratagene). Os DNAs com tamanhos acima de 100 pares de bases (pb) foram selecionados e subclonados no vetor Uni Zap XRTM (Stratagene) entre os sítios de restrição Eco RI e Xho I. Posteriormente foram empacotados em partículas viáveis de fago, através do *Gigapack II packing extracts* (Stratagene). A biblioteca foi titulada como descrito abaixo.

2.2 - Titulação da biblioteca

No dia anterior, 1 colônia de *E. coli* XL1-Blue foi crescida em 5 mL de NZY (suplementado com 50 µl de maltose 20% e 50 µl de MgSO₄ 1 M) a 37°C por 16 horas. No outro dia os 5 mL foram inoculados em 50 mL de NZY (suplementado com 50 µl de maltose 20% e 50 µl de MgSO₄ 1M). A cultura foi crescida por aproximadamente 3 horas. Foi feita uma centrifugação à 5000g por 5 minutos e o pellet foi ressuspensionado em MgSO₄ 10 mM até se obter uma DO₆₀₀=1,0. Foi usado 10 µl da sub-biblioteca sem diluição e com diluições de 1x10⁻¹ e 1x10⁻³ em SM Buffer. Os 10 µl da biblioteca foram acrescentados a 200 µl de bactérias XL1-Blue em MgSO₄ 10 mM. Os fagos da biblioteca e as bactérias foram incubados a 37°C por 15 minutos. A mistura foi adicionado 2 a 3 mL de NZY Top Agar na temperatura de aproximadamente 48°C. Logo em seguida plaqueamos em placas NZY/agar e deixamos solidificar por 10 minutos. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 16 horas.

2.3 - Excisão em massa da sub-biblioteca 34

A biblioteca aqui utilizada é constituída por fagos lambda que possuem em seu genoma o vetor Zap Express contendo o fagemídeo pBluescript II SK- com insertos de DNA originados da glândula de veneno.

É importante salientar que o vetor Zap Express contém duas partes de uma região de origem de replicação (o sítio de iniciação e o de terminação da síntese de DNA) subclonadas separadamente em sua seqüência. Esses sítios são reconhecidos por proteínas M13 expressas pelo fago helper que clivam uma das fitas do DNA dessas regiões. A molécula de $ssDNA$ originada é então circularizada por uma outra proteína do fago helper, formando uma molécula de DNA circular contendo o DNA existente entre os sítios de iniciação e terminação. No caso do vetor Zap Express, isso inclui toda a seqüência do vetor fagemídeo pBluescript e o inserto de DNA clonado, quando presente. A circularização recupera a região de origem de replicação, que está ligada ao envio de sinais para o empacotamento do DNA circular e formação do fagemídeo. Os passos para excisão em massa estão descritos abaixo:

No dia anterior, 1 colônia de XL1-Blue e uma colônia de XL0LR foram crescidas em tubos separados contendo 5 mL de NZY (suplementado com 50 μ L de maltose 20% e 50 μ L de $MgSO_4$ 1 M) a 37°C por 16 horas. Após 16 horas, os 5 mL foram inoculados em 50 mL de NZY (suplementado com 50 μ L de maltose 20% e 50 μ L de $MgSO_4$ 1 M) e a cultura foi crescida por aproximadamente 3 horas. Foi feita uma centrifugação a 1000g por 10 minutos e o pellet foi ressuspendido em $MgSO_4$ 10 mM até se obter uma $DO_{600}=1,0$. Em tubos de 50 mL, a biblioteca de fago λ foi combinada com as bactérias XL1-Blue. Foram usados 10 μ L do fago sem diluição e nas diluições 1×10^{-1} , 1×10^{-2} e 1×10^{-3} e todas as diluições foram combinadas com 600 μ L de bactérias. O fago helper foi usado nas quantidades seguintes: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 μ L. As bactérias contendo os fagos λ e helper foram incubadas a 37°C por 15 minutos para permitir o ancoramento dos fagos às bactérias e infecção das mesmas. Foram adicionados 5 mL de NZY e a mistura foi incubada a 37°C por 2,5-3 horas sob agitação de 180 rpm. Durante esse período, a excisão do pBluescript e a formação dos fagemídeos ocorrem nas bactérias XL1-Blue. O

tubo contendo as bactérias e os fagos foram aquecidos a 65-70°C por 20 minutos para lisar as partículas do fago λ e as células bacterianas, os fagemídeos não são lisados. Foi feita uma centrifugação a 1000g por 10 minutos para baixar o debris celular, o sobrenadante foi guardado em tubos estéreis. Para titular os fagos excisados, combinamos 5 μ l do sobrenadante com 200 μ l de bactérias XLRLR em tubos de 1,5 mL. Os tubos foram incubados 37°C por 15 minutos. Ao tubo foram adicionados 40 μ l de meio NZY 5x (para concentração final de 1x) e incubamos a mistura por mais 45 minutos a 37°C, para permitir expressão do produto do gene de resistência a ampicilina. Foram plaqueados 100 μ l da mistura em placas LB/Agar contendo ampicilina (100 μ g/mL), e estas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

2.4 – Verificação da presença de insertos

As colônias obtidas foram coletadas e submetidas a uma PCR de colônia, como descrito no item I-1.5, para verificação da existência e tamanho dos insertos. A reação e o programa utilizados estão descritos abaixo. As colônias que continham insertos foram submetidas à extração plasmidial (item I-1.6), os plasmídeos foram quantificados, seqüenciados (item I-1.8) e as seqüências obtidas foram analisadas de acordo com item descrito abaixo.

Reação 3

Material	Quantidades
Primer T7 (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Primer T3 (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Taq (1 μ l/5U)	0,2 μ l
DNA	-
dNTP (1 mM)	2,5 μ L
Tampão 1B (10x)	2,5 μ l
Água deionizada estéril	19,3 μ l
Vol. Final	25 μ l

Programa 3

- 1- 94 °C por 3 minutos (desnaturação);
- 2- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 3- 60 °C por 30 segundos (anelamento);
- 4- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 5- Repetir o ciclo 5 vezes a partir da etapa 2;
- 6- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 7- 56 °C por 30 segundos (anelamento);
- 8- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 9- Repetir o ciclo 25 vezes a partir da etapa 6;
- 10- 72 °C por 5 minutos ;
- 11- 4 °C por tempo indefinido

2.5 – Análise das ESTs obtidas

Esta etapa, foi um trabalho em colaboração com o Laboratório de Biodados/ICB do Prof. Miguel Ortega, e foi realizada pelo aluno de doutorado Maurício Mudado.

2.5.1 – Análises Bioinformáticas

As análises bioinformáticas foram feitas em computador de mesa comum com sistema operacional Linux. Os cromatogramas providos de seqüenciador automático (*MegaBACE DNA sequencing* - Amersham) foram processados pelo pacote *phred*, *phrap* *consed* (<http://www.phrap.org>) foram geradas 910 ESTs nomeadas com o programa *phred* com parâmetros default (filtro de corte por qualidade desligado). Essas seqüências foram filtradas para remoção de seqüência do plasmídeo pelo software *cross-match* e depois agrupadas (clusterizadas) com *phrap*.

2.5.2 – Anotação Automática

Foi usado o pacote BLAST do NCBI para alinhar as seqüências obtidas com o UniProt. As seqüências protéicas em formato FASTA do UniProt foram obtidas do sítio do UniProt (<http://www.uniprot.org>), que incluíam seqüências do SwissProt e TrEMBL (total de 5.036.670). Foram obtidas anotações das proteínas do UniProt com ontologias GO (*Gene Ontology*) via projeto GOA (<http://www.ebi.ac.uk/GOA>). As ontologias do GO foram baixadas do sítio <http://www.geneontology.org> e populadas em um bando de dados relacional MySQL. Foi feito um BLASTx com valor de corte de e-value a $1e^{-5}$ e saída m8. Os melhores alinhamentos (*scores*) foram selecionados e populados em banco de dados. Os resultados de anotação com GO foram feitos com ordenação das ontologias pelos valores mais abrangentes das hierarquias de GO (nós mais próximos dos componentes raiz: processos biológicos, componente celular e função molecular).

II – Construção dos cassetes

Foram construídos cassetes de expressão com o DNA de três proteínas do veneno do *T. serrulatus*: TsNTxP, proteína não tóxica, mas muito imunogênica; TsTx, principal toxina α do veneno e TsTx-I, principal toxina β do veneno.

Duas metodologias foram usadas: ligação de mais de uma cópia do DNA da mesma proteína (proteínas em tandem) e ligação de DNA das diferentes proteínas em um mesmo plasmídeo (proteína quimérica).

A proveniência do DNA das proteínas utilizadas está descrita na tabela abaixo.

Tabela 2 – Origem do DNA das proteínas

Proteína	Origem
TsNTxP	Vetor de expressão pMAL
TsTx-I	Clone da Biblioteca de cDNA
TsTx	Clone da Biblioteca de cDNA

1 - Construção de proteínas em tandem

O plasmídeo que foi utilizado para a montagem das proteínas em tandem é o pBluescript II KS-, por apresentar uma grande variedade de sítios de enzimas de restrição o que permite a inserção de vários fragmentos (Figura 15). Foram clonados no pBluescript 1, 2 e 4 cópias de TsTx-I. A primeira cópia foi inserida no sítio de restrição Hind III. Na segunda montagem (tandem de duas seqüências - di), o vetor pBluescript que contém a seqüência da TsTx-I inserida no sítio de restrição da Hind III foi utilizado para a clonagem de mais um fragmento de DNA da TsTx-I no sítio de restrição Sal I. Na terceira construção (tandem de quatro seqüências - tetra), os dois fragmentos de DNA que codificam para TsTx-I foram amplificados juntos e inseridos no sítio de restrição Eco RI (Figura 16). Todas estas etapas foram feitas pelo uso de primers construídos para amplificar a seqüência da TsTx-I, mas que continham

os sítios de restrição a serem utilizados em cada montagem, permitindo assim a inserção dos fragmentos de DNAs nos locais desejados.

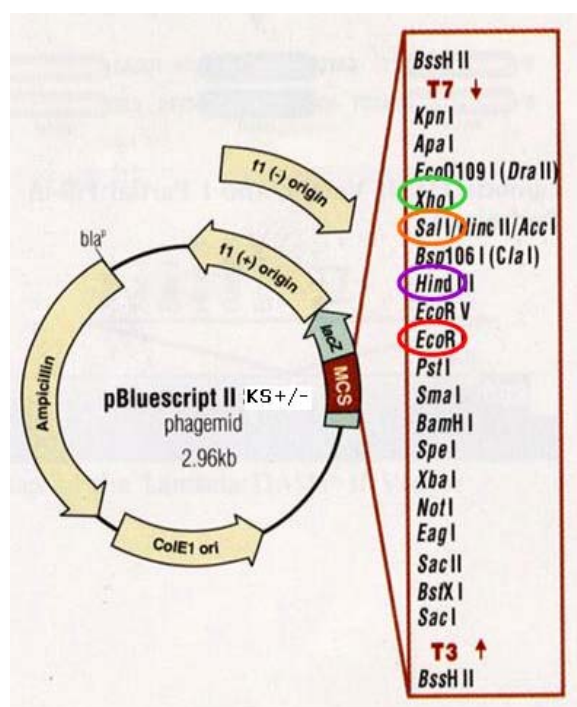


Figura 15 – Mapa do vetor pBluescript II KS +/-. No quadro em destaque podemos ver o sítio múltiplo de clonagem (MCS). Os sítios das enzimas de restrição que foram utilizadas neste trabalho estão circulados.

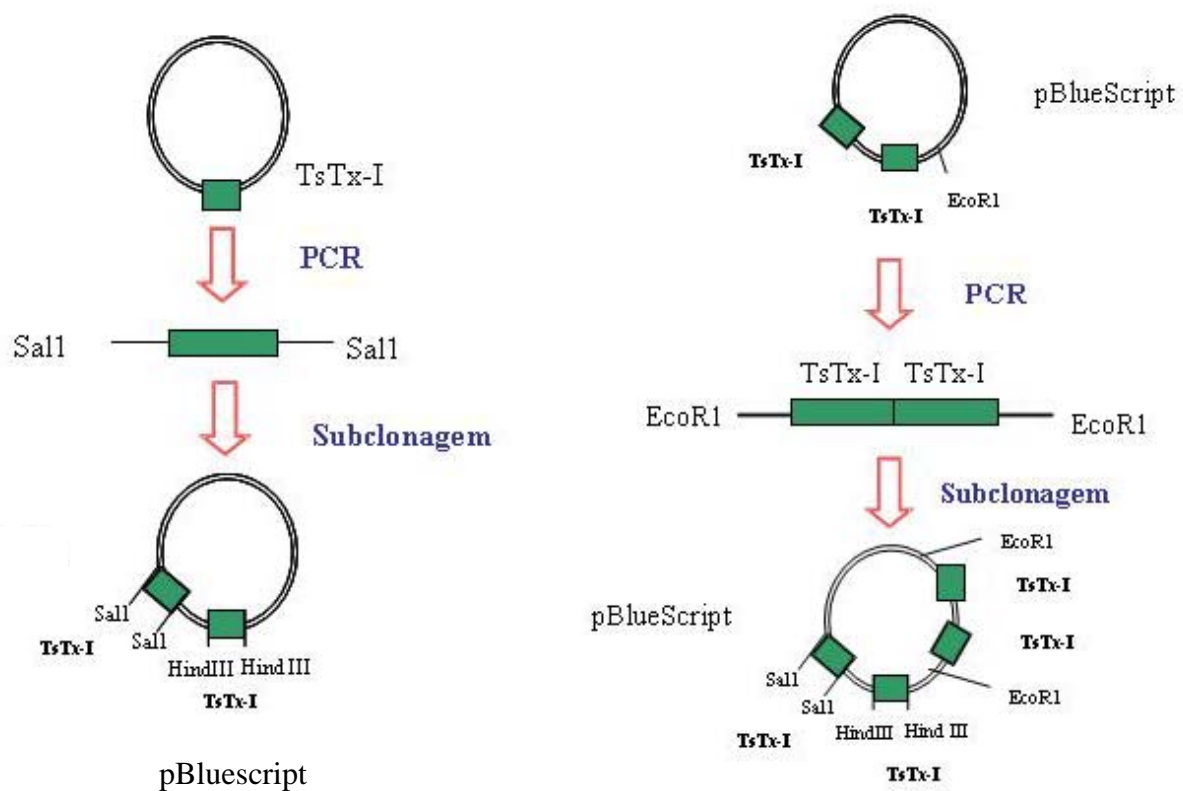


Figura 16 – Construção de proteínas em Tandem da TsTx-I.

1.1 - Clonagem do DNA da TsTx-I em pGEM

Da biblioteca de cDNA foi isolado um clone (1D6) contendo a sequência da toxina TsTx-I. O DNA foi então amplificado (20 reações – reação e programa estão descrito abaixo), misturado ao tampão de amostra *Loading Buffer* e aplicado em gel de agarose 1%. Após coloração, a banda de interesse foi cortada do gel e purificada como descrito no item I-1.3.1. O DNA purificado foi ligado ao vetor pGEM T Easy (item I-1.3.2). O produto da ligação foi transformado em bactérias DH5 α como descrito abaixo (item II-2) e das colônias provenientes foi feito uma PCR de colônia (item I-1.5). Algumas colônias foram selecionadas e utilizadas para extração plasmidial (item I-1.6). Os clones foram então cortados com a enzima de restrição Hind III para comprovação da clonagem e os clones que apresentaram liberação da banda de tamanho esperado foram seqüenciados (itens I-1.7 e 1.8).

Reação 4

Materiais	Quantidades
Primer Senso (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Primer anti-senso (20 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Taq (1 μ l/5U)	0,2 μ l
DNA molde	100-200 μ g
dNTP (1 mM)	2,5 μ L
Tampão 1B (10x)	2,5 μ l
Água deionizada estéril	q.s.p 25 μ l

Programa 4

- 1- 94 °C por 3 minutos (desnaturação);
- 2- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 3- 58 °C por 35 segundos (anelamento);
- 4- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 5- Repetir o ciclo 5 vezes a partir da etapa 2;
- 6- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 7- 54 °C por 30 segundos (anelamento);
- 8- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 9- Repetir o ciclo 25 vezes a partir da etapa 6;
- 10- 72 °C por 5 minutos ;
- 11- 4 °C por tempo indefinido

1.2 - Transformação química

1.2.1. - Bactérias quimicamente competentes

Foi feita uma estria nova das bactérias *E. coli* DH 5 α em LB/ágar na noite anterior. Foram coletadas 1-5 colônias e essas foram crescidas por 2-3 horas em meio LB, até atingir uma DO₆₀₀= 0,5-0,6. Foi feita uma centrifugação das células a 1500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuscitado em 40 mL de tampão Tfb I gelado por 100 mL de cultura. Os tubos contendo a cultura foram deixados no gelo por 5-10 minutos e centrifugadas novamente. O pellet foi ressuscitado gentilmente com 4 mL de Tfb II gelado por 100 mL de cultura. As bactérias foram aliquotadas em tubos de 500 μ l (100-200 μ l) e estocadas a -80°C.

1.2.2 - Transformação química

As células foram descongeladas no gelo. Foram acrescentados 2 μ l da ligação a 40 μ l de células (as células ficam saturadas com a razão de 1 ng de DNA por μ l de células). A mistura foi deixada por 30 minutos no gelo. E então

transferidas para banho a 42°C por 90 segundos e imediatamente transferidas para o gelo. Foram adicionados 800 µl de meio SOC e as células foram incubadas por 45 minutos a 37°C. Foram plaqueadas em LB/ágar com antibiótico (ampicilina 100 µg/mL).

1.3 - Subclonagem do DNA da TsTx-I em pBluescript

1.3.1- Obtenção do pBluescript

A extração em grande escala do plasmídeo pBluescript II KS- contido em *E. coli* DH5α foi feita de acordo com o método de lise alcalina-SDS descrito por Sambrook e cols. (1989).

O plasmídeo foi purificado com fenol, como descrito a seguir. Ao pBluescript foi adicionado o mesmo volume de fenol e misturado bem. Foi feita uma centrifugação à 12000g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase superior que contém o DNA foi recolhida e transferida para outro tubo, o fenol que está na fase inferior foi descartado. À fase do DNA foi adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio (1:1), foi misturado e depois centrifugado a 12000g por 5 minutos em temperatura ambiente. Novamente a fase superior foi recolhida e transferida para outro tubo, e a esta foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Misturamos e centrifugamos a 12000g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase superior foi recolhida e passada para um novo tubo. A esta foi adicionados 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 99%. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. E centrifugada a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com etanol 70% e depois de seco, ressuspendido em TE pH 8,0.

O plasmídeo purificado com fenol foi cortado com as enzimas de restrição Xho I, Sal I, Hind III e Eco RI como já descrito (item I-1.7) para verificar se sua qualidade estava boa. O vetor foi seqüenciado e analisado (itens I-1.8 e 1.9).

1.3.2 - Purificação do DNA TsTx-I

O clone A1 que contém o DNA da TsTx-I em pGEM (15 µg) foi cortado com a enzima Hind III (item I-1.7). Depois do corte, o clone A1 cortado foi precipitado e submetido a gel de agarose 1%, a banda correspondente ao fragmento de DNA da TsTx-I foi recortado do gel e o DNA purificado pelo método da sílica (item I-1.3.1).

1.3.3 - Desfosforilação de plasmídeo

O vetor pBluescript (15 µg) foi cortado com a enzima de restrição Hind III (item I-1.7). Depois do corte, o vetor foi precipitado e desfosforilado, como descrito abaixo.

Depois do corte com enzima de restrição, o DNA foi precipitado e ressuspenso na proporção 10 pmols (end) para 40 µl de Tris 10 mM pH 8,0 (1 µg de 1000 pb de DNA = 1,52 pmols de DNA = 3,03 pmols end). A enzima CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) foi diluída em tampão próprio (CIAP buffer Reaction 1x) para concentração final de 0,01 U/µl. Cada pmol de DNA end requer 0,01 U de CIAP. A reação foi feita da seguinte maneira:

Material	Quantidades
DNA (10 pmols end)	40 µl
CIAP buffer Reaction 10x	5 µl
CIAP (0,01 U/µl)	5 µl
Volume final	50 µl

A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Foi adicionada outra alíquota de CIAP diluída (5 µl) e a incubação a 37°C continuou por mais 30 minutos. Foram adicionados 300 µl de CIAP stop buffer para 10 pmols end. A purificação foi feita com fenol:clorofórmio (1:1) e o DNA foi precipitado com 0,5 volumes de acetato de amônia 7,5 M pH 5,5 e 2 volumes de etanol 99%. O precipitado foi ressuspenso em TE 0,5x.

1.3.4 - Ligação do DNA da TsTx-I no vetor pBluescript

A reação de ligação do DNA purificado da TsTx-I em pBluescript desfosforilado foi realizada da seguinte maneira:

<div>Vetor</div> <div>100 µg/µl</div> <div>DNA 100 µg/µl</div>	0,5 µl	1,0 µl	1,5 µl
0,5 µl	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 7,4 µl de H ₂ O	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 6,9 µl de H ₂ O	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 6,4 µl de H ₂ O
1,0 µl	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 6,9 µl de H ₂ O	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 6,4 µl de H ₂ O	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 5,9 µl de H ₂ O
1,5 µl	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 6,4 µl de H ₂ O	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 5,9 µl de H ₂ O	0,6 µl de T4 U/µl 1 µl de tampão 10x 5,4 µl de H ₂ O

A reação foi misturada bem e deixada incubando 16 horas a 16°C. Após esse tempo, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 96%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000g durante 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, ressuspendido em 4 µl de água deionizada e mantido a 4°C.

O produto da ligação foi utilizado para transformar quimicamente bactérias DH5α de acordo com item II-2.

As colônias obtidas foram submetidas a PCR de colônia (item I-1.5). A reação e o programa utilizados estão descritos abaixo.

Reação 5

Materiais	Quantidades
Primer Senso (20 pmol/ μ l)	0,15 μ l
Primer anti-senso (20 pmol/ μ l)	0,15 μ l
Taq κ 2(1 μ l/5U)	0,4 μ l
DNA	-
dNTP (1 mM)	2,5 μ L
Tampão V(30) (10x)	2,5 μ l
Água deionizada estéril	19,3 μ l
Vol. Final	25 μ l

Programa 5

- 1- 94 °C por 3 minutos (desnaturação);
- 2- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 3- 58 °C por 35 segundos (anelamento);
- 4- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 5- Repetir o ciclo 5 vezes a partir da etapa 2;
- 6- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 7- 54 °C por 30 segundos (anelamento);
- 8- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 9- Repetir o ciclo 25 vezes a partir da etapa 6;
- 10- 72 °C por 5 minutos ;
- 11- 4 °C por tempo indefinido.

Das colônias positivas, foram extraídos os plasmídeos (item I-1.6) e esses foram cortados com a enzima Hind III (item I-1.7). Os clones foram seqüenciados de acordo com item I-1.8.

1.3.5 – Clonagem do DNA da TsTx-I no vetor pET 11a

O clone 16 (vetor pBluescript+TsTx-I₍₁₎) foi amplificado utilizando primers novos que vão inserir o sítio de restrição da enzima Bam HI.

Primer pET-TsTx-I Senso 1 [GGA TCC](#) ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT

Primer pET-TsTx-I Anti-senso 1 [GGA TCC](#) TCA GAT ATC AAG CTT ACA TTT GTT

A PCR foi então padronizada. A temperatura de anelamento média dos primers é 56,6°C. Várias temperaturas foram testadas, o Programa 4 foi utilizando, mas as duas temperaturas de anelamento foram modificadas: 56/52°C, 54/52°C, 58/54°C, 60/56°C. Três tampões foram testados: IB, IC e V(30), todos da marca PHT.

Os melhores programa e tampão foram utilizados para uma amplificação em larga escala. O amplicon foi precipitado e corrido em gel de agarose 1%. A banda de interesse foi cortada e o DNA foi purificado pelo método da Sílica/Guanidina (item I-1.3.1). Este foi ligado no vetor pGEM (item I-1.3.2) e o produto da ligação foi transformado (item II-2). As colônias obtidas foram passadas para uma placa com X-gal e IPTG e as colônias brancas e azuis claras foram analisadas por PCR de colônia (item I-1.5). Das colônias positivas o plasmídeo foi extraído por lise alcalina (item I-1.6).

Os plasmídeos obtidos foram purificados com resina Sephacryl S-400 para retirar impurezas. A resina (500 µl) foi acrescentada no tubo apropriado, que foi centrifugado 1 minuto a 1000g. O tampão (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA) foi acrescentado (500 µl) e foi feita uma nova centrifugação na mesma velocidade e tempo. O procedimento foi repetido duas vezes o procedimento anterior. Acrescentar o plasmídeo (2 µg) com 20 µl de água destilada. Centrifugar 2 minutos a 2000g. Usar o sobrenadante eluído para o corte com a enzima Bam HI (item I-1.7). Os plasmídeos que liberaram fragmento do tamanho esperado foram seqüenciados (item I-1.8).

O clone 31b continha o DNA da TsTx-I inserido corretamente no sítio da Bam HI. Este clone foi utilizado para a clonagem da TsTx-I no vetor de expressão pET 11a. Os dois vetores foram cortados com a enzima Bam HI (item I-1.7). As pontas do vetor pET foram desforiladas (item II-1.3.3). O clone

31b cortado foi corrido em gel de agarose 1% e a banda de interesse foi cortada e purificada pelo método descrito abaixo.

O protocolo “freezing squeeze” para purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose foi descrito por Tautz e Renz (1983). Esse método é muito fácil de fazer, é rápido e não inclui nenhuma extração com reagentes tóxicos. É barato, pois não precisa de agarose low melting. A recuperação do produto é de aproximadamente 50% ou mais. O gel deve ser corrido em TAE novo. A banda cortada deve ser colocada em um tubo com 10 mL de tampão acetato (300 mM de acetato de sódio, 1 mM de EDTA pH 7,0). Incubar com leve agitação por 30 minutos no escuro. Colocar o pedaço de gel em um tubo com um filtro, esfriar por 30 minutos a -70°C e centrifugar, sem prévio descongelamento, por 15 minutos a 12000g. Ao eluído, adicionar 1/100 volume de MgCl_2 1 M (em ácido acético glacial) e 2,5 volumes de etanol absoluto, incubar por pelo menos 1 h a -20°C . Centrifugar por 15 minutos a 12000 g, lavar o pellet com etanol 70% e deixar secar. Ressuspender o pellet seco em 20 μl de água destilada. O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 1%.

O DNA da TsTx-I purificado e o pET desfosforilados foram ligados como descrito abaixo.

Material	Quantidade
Vetor	100 ng
inserto	*100/ 200/ 300 ng
T4 DNA Ligase (3 U/ μl)	1 μl
Tampão de ligação 2x	5 μl
Água deionizada	q.s.p 10 μl
Volume final	10 μl

*Cada uma das quantidades de inserto representam ligações individuais, ou seja, realizadas em tubos diferentes.

A reação foi homogeneizada e deixada incubando por 16 horas a 4°C . Após esse tempo, o conteúdo dos três tubos foi transferido para um único tubo e o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2

volumes de etanol 96%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000g durante 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, ressuspendido em 4 µl de água deionizada e mantido a 4°C.

O produto da ligação foi transformado em bactérias DHα5 (item I-1.4.2). As colônias positivas foram verificadas por PCR de colônia (item I-1.5) e os seus plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (item I-1.6). Os clones analisados por corte com enzima de restrição e PCR (item I-1.7 e reação e programa 4). Os plasmídeos que continham o inserto foram seqüenciados (item I-1.8).

1.4 - Montagem da TsTx-I com 2 cópias de DNA

Como no clone 14 foram inseridas 2 cópias do DNA da TsTx-I, foi necessário apenas sua clonagem no vetor pET 11a.

Novos primers foram construídos para inserção do sítio de restrição da Bam HI (onde o DNA devia ser inserido no pET). A reação com os primers novos teve que ser padronizada como no item II-1.3.5. Todos os procedimentos para clonagem do DNA da TsTx-I₍₂₎ no pET foram os mesmos descritos no item II-1.3.5.

Primer pET-TsTx-I Senso 1 [GGA TCC](#) ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT

Primer pET-TsTx-I Anti-senso 1 [GGA TCC](#) TCA GAT ATC AAG CTT ACA TTT GTT

1.5 - Montagem da TsTx-I com 4 cópias de DNA

1.5.1 – Subclonagem no vetor pBluescript

Novos primers foram construídos para inserção do sítio de restrição Eco RI no DNA da TsTx-I₍₂₎. Sendo assim, o DNA contendo 2 cópias da toxina após amplificação com estes primers teria nas pontas do fragmento inseridos o sítio da Eco RI. Este fragmento foi inicialmente inserido no vetor pGEM e depois ele foi cortado e inserido no sítio da Eco RI do clone 14, que já continha 2 cópias da TsTx-I no sítio de restrição da Hind III, ficando assim com 4 cópias da toxina.

Primer TsTx-I₍₄₎ Senso 1 [GAA TTC](#) ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT

Primer TsTx-I₍₄₎ Anti-senso 1 [GAA TTC](#) GAT ATC AAG CTT ACA TTT GTT

Todos os procedimentos para padronização dos primers e clonagem do fragmento de DNA da TsTx-I com 2 cópias no clone 14 foram os mesmos descritos no item II-1.3.5.

1.5.2 – Clonagem no vetor pET 11a

Após a obtenção do vetor pBluescript com 4 cópias do DNA da TsTx-I, fragmento de DNA TsTx-I₍₄₎ foi inserido no vetor de expressão pET 11a. Para isso, foi necessário a inserção no fragmento do sítio de restrição da enzima Bam HI. Então novos primers foram construídos. O clone A6 (com 4 cópias de TsTx-I) foi amplificado com os primers descritos abaixo.

pBluescript Senso 1 5' [GGA TCC](#) AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC 3'

pBluescript Senso 2 5' [GGA TCC](#) GGG CCC CCC CTC GAG GTC GAC 3'

pBluescript anti-senso 1 5' CGC TCT AGA ACT AGT [GGA TCC](#) CCC GGG TCA 3'

pBluescript anti-senso 2 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC [GGA TCC](#) TCA 3'

A PCR foi então padronizada. Inicialmente foi utilizado uma máquina de PCR Eppendorf que faz gradiente, para tentar identificar qual a faixa de

temperatura seria melhor para o anelamento dos primers. O programa está descrito abaixo. Depois várias temperaturas foram testadas, o programa 4 foi utilizando, mas as duas temperaturas de anelamento (5 ciclos com uma temperatura e 25 ciclos com outra) foram modificadas: 50/48, 54/52, 56/54°C, 58/56°C, 58/54°C, 60/56°C, 62/58°C, 64/60°C, 66/62°C, 68/64°C. Três tampões foram testados: IB, IC e V(30), todos da marca PHT.

Programa 6

- 1- 94 °C por 3 minutos (desnaturação);
- 2- 94 °C por 30 segundos (desnaturação);
- 3- 60 °C por 35 segundos (anelamento);
- Gradiente 8,0 °C
- 4- 72 °C por 30 segundos (extensão);
- 5- 72 °C por 5 minutos ;
- 6- 4 °C por tempo indefinido

Well	Temp.	Well	Temp.
1	52,1	7	61,8
2	52,7	8	63,9
3	53,8	9	65,7
4	55,5	10	67,2
5	57,4	11	68,2
6	59,6	-	-

Os melhores programas e tampões foram utilizados para uma amplificação em larga escala. O amplicon foi precipitado e corrido em gel de agarose 1%. A banda de interesse foi cortada e o DNA foi purificado com kit da promega “Wizard SV gel and PCR clean-up System” de acordo com as instruções do fabricante. Este foi ligado no vetor pGEM (item I-1.3.2) e o produto do produto da ligação foi transformado (item II-2). Vinte colônias foram selecionadas e tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina (item I-1.6). Destes 10 clones foram analisados por corte com enzima de restrição e PCR

(item I-1.7e reação e programa 4). Os plasmídeos que continham o inserto foram seqüenciados (item I-1.8).

O clone 4.1 continha o DNA da TsTx-I₍₄₎ inserido corretamente no vetor. Este clone foi utilizado para a clonagem no vetor de expressão pET 11a. Os dois vetores foram cortados com a enzima Bam HI (item I-1.7). As pontas do vetor pET foram desforiladas (item II-1.3.3). O clone 4.1 cortado foi corrido em gel de agarose 1% e a banda de interesse foi cortada e purificada com kit da promega “Wizard SV gel and PCR clean-up System” de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA da TsTx-I (4) purificado e o pET desfosforilados foram ligados como descrito abaixo.

Material	Quantidade
Vetor	100 ng
Inserto	*100/ 200/ 400 ng
T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	1 μ l
Tampão de ligação 2x	5 μ l
Água deionizada	q.s.p 10 μ l
Volume final	10 μ l

*Cada uma das quantidades de inserto representam ligações individuais, ou seja, realizadas em tubos diferentes.

A reação foi homogeneizada e deixada incubando por 16 horas a 4°C. Após esse tempo, o conteúdo dos três tubos foi transferido para um único tubo e o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 96%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000g durante 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e depois de seco, ressuspendido em 4 μ l de água deionizada e mantido a 4°C.

O produto da ligação foi transformado em bactérias Topo 10 (item II-2). Vinte colônias foram escolhidas e os seus plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (item I-1.6). Os clones foram analisados por corte com enzima de restrição e PCR (item I-1.7e reação e programa 4). Os plasmídeos que continham o inserto foram seqüenciados (item I-1.8).

2 - Construção da proteína quimérica

Nessa parte foram utilizadas a sequência de nucleotídeo das proteínas TsNTxP, TsTx e TsTx-I e a partir delas primers foram construídos para amplificá-las (Figura 14). Para a montagem dessa proteína também foi utilizado o vetor pBluescript II KS-. A sequência de DNA que codifica para TsNTxP foi inserida no sítio de restrição da Xho I, a da TsTx foi inserida em Sal I e a da TsTx-I foi inserida em Hind III. As sequências de nucleotídeos das três proteínas já foram descritas, o que nos possibilitou a construção dos primers para amplificar a região da proteína madura de cada uma delas. Os primers das toxinas foram sintetizados com o sítio de restrição específico para cada uma delas nas pontas, permitindo assim a inserção dos DNAs nos locais desejados. Primeiramente os DNAs foram inseridos em um vetor de fácil clonagem, o vetor pGEM T Easy e em seguida cortados e inseridos no pBluescript II KS- (Figuras 12 e 17).

A sequência de nucleotídeos da TsNTxP já tinha sido obtida da biblioteca de cDNA da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e clonada no vetor pMAL (Guatimosim e cols., 1999; Mendes e cols., 2004). Este vetor foi amplificado com os primers que introduziram o sítio de restrição da enzima Xho I ao DNA da TsNTxP.

Neste trabalho, através da busca de novas sequências de proteínas na biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *T. serrulatus*, as sequências de nucleotídeos da TsTx-I e TsTx foram obtidas e usadas para as construções das proteínas recombinantes.

Os primers utilizados são os descritos na Figura 14.

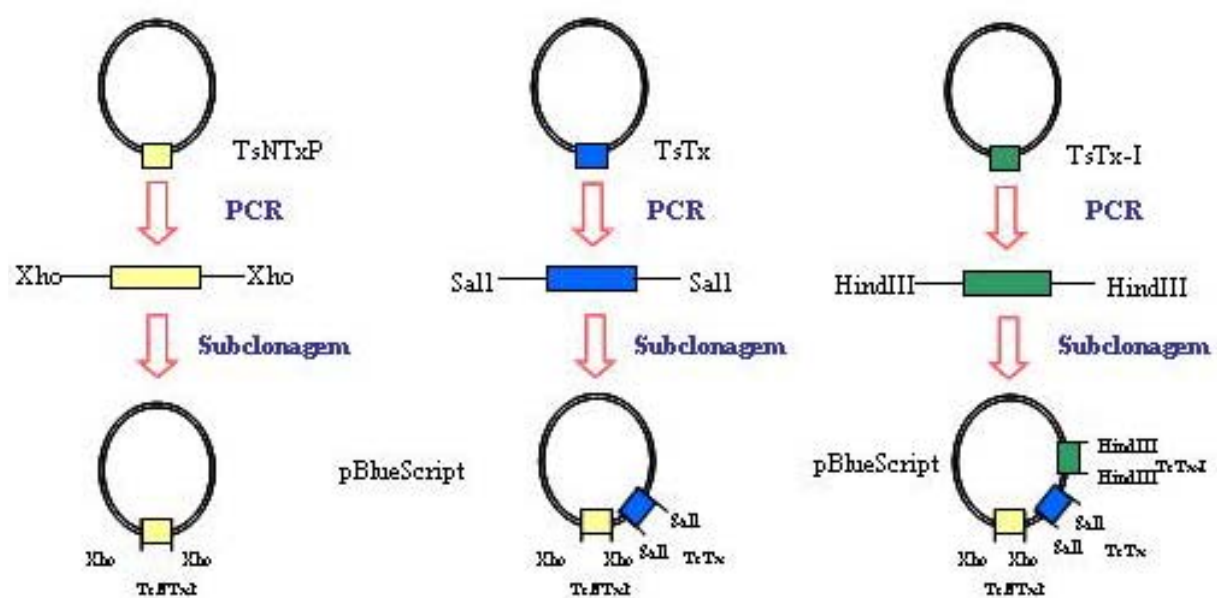


Figura 17 - Construção da proteína quimérica.

2.1 – Obtenção do DNA da TsNTxP

O clone 1 do vetor pMAL com o DNA da TsNTxP inserido foi usado como molde para amplificar o DNA da proteína com os novos primers, que inseriram o sítio da enzima Xho I nas pontas do fragmento. Os primers estão descritos na Figura 14. O programa e reação 4 descritos anteriormente foram usados para esta amplificação.

O amplicon foi corrido em um gel de agarose 1% e a banda de interesse foi cortada e purificada pelo método da sílica/guanidina (item I-1.3.1). O DNA da TsNTxP purificado foi ligado no vetor pGEM como descrito anteriormente (item I-1.3.2). O produto da ligação foi transformado em bactérias DH5 α (item I-1.4.2) e 24 colônias foram selecionadas para a extração plasmidial (item I-1.6). Destes 14 foram cortados com a enzima Xho I para verificar se a ligação funcionou (item I-1.7) e os clones positivos foram seqüenciados (item I-1.8).

2.2 – Ligação do DNA da TsNTxP ao pBluescript+TsTx-I

Os clones 14 (pBluescript+TsTx-I₍₂₎) e 16 (pBluescript+TsTx-I₍₁₎) foram cortados com Xho I e tiveram suas pontas desfosforiladas (itens I-1.7 e II-1.3.3). O clone 50(5) – pGEM+TsNTxP – foi cortado com Xho I, corrido em gel de agarose 1% e a banda de interesse cortada e purificada pelo método da sílica guanidina (itens I-1.7 e I-1.3.1). Os vetores pBluescript cortados e o DNA da TsNTxP purificado foram ligados com descrito anteriormente (item II-1.3.4). O produto da ligação foi transformado em bactérias (item II-1.2.2), as colônias obtidas foram analisadas por PCR de colônia (item I-1.5). As positivas tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina (item I-1.6). Os clones foram analisados por PCR e corte com as enzimas de restrição Xho I e Hind III (Programa e reação 4 e item I-1.7), os que liberaram fragmentos do tamanho esperado foram seqüenciados (item I.1.8).

2.3 – Obtenção do DNA da TsTx

O clone 3E9 da biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *Tityus serrulatus* contendo o DNA da TsTx inserido foi usado como molde para amplificar o DNA desta toxina com os primers que inseriram o sítio da enzima Sal I nas pontas do fragmento. Os primers estão descritos na Figura 14. O programa e reação 4 descritos anteriormente foram usados para esta amplificação.

O amplicon foi corrido em um gel de agarose 1% e a banda de interesse foi cortada e purificada pelo método da sílica/guanidina (item I-1.3.1). O DNA da TsTx purificado foi ligado no vetor pGEM como descrito anteriormente (item I-1.3.2). O produto da ligação foi transformado em bactérias DH5 α (item II-1.4.2). Das colônias obtidas os plasmídeos foram extraídos (item I-1.6). Todos os clones foram cortados com a enzima Sal I para verificar se a ligação funcionou (item I-1.7) e os clones positivos foram seqüenciados (item I-1.8).

2.4 - Ligação do DNA da TsTx ao pBluescript+TsTx-I+TsNTxP

Os clones 14(1) - pBluescript+TsTx-I₍₂₎+TsNTxP e 16(36) - pBluescript+TsTx-I₍₁₎+TsNTxP foram cortados com Sal I e tiveram suas pontas desfosforiladas (itens I-1.7 e II-1.3.3). O clone 3 – pGEM+TsTx – foi cortado com Sal I, corrido em gel de agarose 1% e a banda de interesse cortada e purificada pelo método “freeze squeez” (itens I-1.7 e II-1.3.5). Os vetores pBluescript cortados e o DNA da TsTx purificado foram ligados com descrito abaixo. O produto da ligação foi transformado em bactérias DH5 α (item I-1.4.2), as colônias obtidas foram analisadas por PCR de colônia (item I-1.5). As positivas tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina (item I-1.6). Os clones foram analisados por corte com as enzimas de restrição Sal I (item I-1.7), os que liberaram fragmentos do tamanho esperado foram seqüenciados (item I.1.8).

Material	Quantidade
Vetor	100 ng
inserto	100 ng
T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	1 μ l
Tampão de ligação 2x	5 μ l
Água deionizada	q.s.p 10 μ l
Volume final	10 μ l

III - Expressão

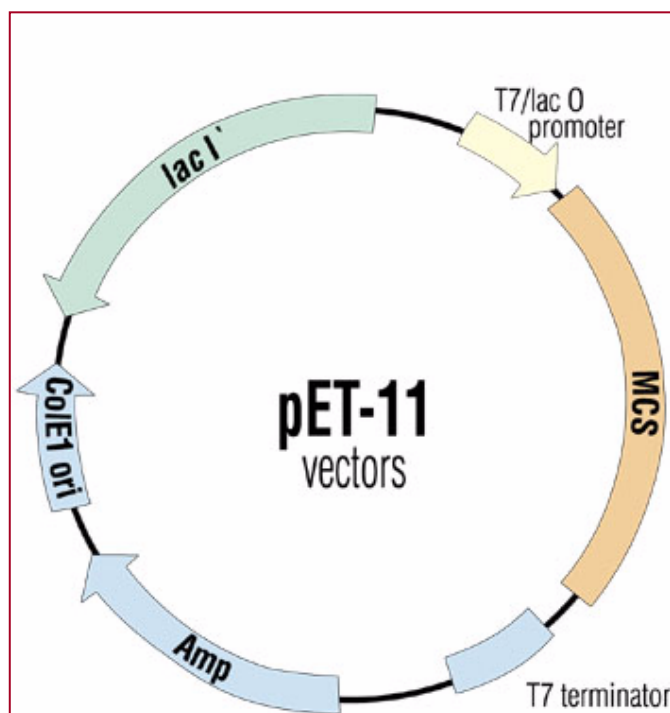
1- Sistema de expressão

A expressão das proteínas recombinantes foi realizada no vetor pET 11a (Stratagene – Figura 18). O sistema de expressão pET é um dos sistemas mais utilizados para clonagem de expressão *in vivo* de proteínas recombinantes em *E. coli*. Isto devido à alta seletividade da RNA polimerase do bacteriófago T7 em reconhecer a sequência do promotor T7; o alto nível de atividade da T7 polimerase e eficiente tradução mediada pelos sinais de iniciação da tradução do gene 10.

O vetor de expressão pET é derivado do plasmídeo pBR322 e desenvolvido com a característica do gene 10 do bacteriófago T7 que promove altos níveis de transcrição e tradução.

No sistema pET, a sequência da proteína de interesse codificada é clonada após o promotor T7 e em frame com a sequência líder do gene 10. A T7 RNA polimerase integrada cromossomicamente no cassete pelo promotor LacUV5 do plasmídeo DE que está dentro da *E. coli* BL21, é expressa preferencialmente quando é acrescentado IPTG no meio de cultura. Sendo assim a proteína de interesse começa a ser expressa após indução com IPTG, uma característica que é muito importante se o gene a ser expresso é tóxico para a célula.

Alternativamente, os vetores pET 11 contêm sítios de clonagem para Bam HI em todas três janelas de leitura relativa à janela de leitura ao gene 10. A clonagem usando o sítio da Bam HI resulta na proteína de fusão contendo 14 aminoácidos N-terminal do gene 10 (Figura 18).



pET-3a, 11a

fMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGlyCysEND
 GAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGC GGATCCGGCTGCTAA...
 RBS Nde I, Nhe I* BamH I

Figura 18 - Representação esquemática e mapa da região MCS do vetor pET 11a. No retângulo, estão mostrados o sítio de ligação dos ribossomos (RBS) e os sítios das enzimas de restrição que podem ser usadas para a clonagem.

2 - Expressão piloto e curva de expressão da proteína recombinante em células de bactérias da linhagem BL21 DE 3

Após a seleção do clone com corte de enzima de restrição e seqüenciamento, este foi submetido à análise de expressão. Foi realizada uma expressão piloto e uma curva de expressão com meio de cultura 2xYT broth. Bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3) e Origami foram transformadas (item II-1.2.2) com o plasmídeo contendo a proteína recombinante clonada. As bactérias foram crescidas em placa contendo meio LB/ágar e ampicilina 100 µg/mL ou tetraciclina+Clorofenicol (12,5 e 30 µg/mL) durante 18 horas a 37°C. Posteriormente uma colônia isolada foi crescida a 37°C em 3 mL de meio 2xYT contendo antibiótico adequado durante 16 horas. Cem microlitros dessa cultura foram adicionados em 10 mL de meio 2xYT contendo antibiótico nas mesmas concentrações. As células foram mantidas à 37°C, 180 rpm até que atinjam $DO_{600} = 0.5$. No momento em que a cultura atingiu essa densidade celular, foi feita a indução da expressão da proteína recombinante através da adição de IPTG para a concentração final de 0,6 mM. Alíquotas de 500 µl foram retiradas após 16 horas (expressão piloto) ou de 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas de incubação após a adição de IPTG (curva de expressão). Cada alíquota foi centrifugada a 14000g por 2 minutos em microcentrífuga e ressuspensa com tampão de amostra para SDS-PAGE 2x (25 µl para o tempo 0 e 50 µl para os demais tempos de incubação) para posterior corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (item III-8).

3 - Expressão em larga escala

Uma colônia isolada foi inoculada em 40 mL de 2xYT com 100 µg/mL de ampicilina e crescida por 16 horas à 37°C, com agitação de 180 rpm. Essa cultura foi adicionada a 2 L de 2xYT contendo 100 µg/mL de ampicilina em elermeyer de 6 L. Após as células atingirem $DO_{600}=0,5$ uma alíquota de 1 mL era retirada (tempo sem indução) e então o IPTG era adicionado na concentração final de 0,6 mM e as células continuaram crescendo por 4 horas a temperatura de 37°C. Então, as células eram centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. O pellet era ressuspensionado em tampão de lise (materiais e métodos) e as células ressuspensionadas eram lisadas (item III-5). Uma alíquota de 10 µl era diluída em 10 µl de tampão de amostra SDS-PAGE 2x (tempo 4 horas). Um gel de poliacrilamida era corrido com estas amostras para verificar a expressão.

4 – Expressão no fermentador

Inicialmente, era feita uma triagem para verificar qual colônia estava expressando. Então, o plasmídeo contendo o DNA da toxina de interesse era transformado em bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3)⁻ como descrito no item item II-1.2.2. Dez colônias eram coletadas e inoculadas em 1 mL de 2xYT/Ampicilina, em seguida era feito crescimento de 16 horas a 37°C com 180 rpm de agitação. Após este período, 10 µl de cultura foram inoculados em 10 mL de 2xYT/Amp e as bactérias eram crescidas até $DO_{600}=0,5$; quando eram inoculadas com 0,6 mM de IPTG. Depois de 4 horas de expressão, as células eram centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. O pellet era ressuspensionado em 0,5 mL de tampão de lise (materiais e métodos). Uma alíquota de 10 µl era diluída em 10 µl de tampão de amostra SDS-PAGE 2x. Um gel de poliacrilamida era corrido com estas amostras para verificar qual colônia estava expressando.

O pré-inóculo de uma dessas colônias que estavam expressando era usado para fazer o pré-inóculo da expressão no fermentador. Cem microlitros deste pré-inóculo era inoculado em 100 mL de 2xYT/Amp e crescidos 16 horas a 37°C com 180 rpm de agitação.

O fermentador utilizado é da marca BioFlo[®] 110 Bench-Top Fermentor que possui dorna de 7 litros. Para os experimentos neste trabalho foram expressos 5 litros de 2xYT/Amp, inoculados com 100 mL de cultura pré-crescida. Os parâmetros que foram controlados foram pH ($7,0 \pm 0,2$), temperatura ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), agitação (mínima de 300 rpm e máxima de 500 rpm) e oxigênio dissolvido ($35\% \pm 1$). A cada 1 hora uma alíquota era retirada para medir a absorbância e acompanhar a curva de crescimento da bactéria. As bactérias eram crescidas até $\text{DO}_{600}=0,5$; quando eram inoculadas com 0,6 mM de IPTG. Depois de 4 horas de expressão, as células eram centrifugadas a 8000g por 15 minutos (centrífuga Sorvall). O sobrenadante era descartado e o pellet era congelado a -80°C e mantido nesta temperatura por 18 horas. Decorrido este tempo, os pellets eram ressuspensos em tampão de lise e lisozima na concentração de 4 mg/mL em tampão de lise era então adicionada. Mais uma vez as células eram mantidas a -80°C por 18 horas. Em seguida era realizada a lise bacteriana como descrito no item III-5, mas a sonicação era realizada 10 vezes, ao invés de 3. Alíquotas de 10 μl de todas as amostras eram diluídas em 10 μl de tampão de amostra SDS-PAGE 2x. Um gel de poliacrilamida era corrido com estas amostras para verificar a expressão.

5 - Lise celular

Após o período de incubação ideal as células foram centrifugadas a 3000g por 15 minutos a 4°C e congeladas para posterior lise celular. O precipitado foi ressuspensado em tampão de lise contendo 4 mg/mL de lisozima, e congelado em gelo seco/etanol e posteriormente incubada em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes e então o extrato foi sonicado (três pulsos de 20 segundos a 40% de amplitude por 3 vezes). Posteriormente o extrato foi centrifugado (15 minutos à 8000g) e os sobrenadantes submetidos à dosagem de proteínas (item III-6).

6 - Dosagem de proteínas

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

Deve-se usar uma placa de ELISA ou de cultura de células de 96 wells. Separar a primeira coluna para o branco e a segunda para o padrão. Na primeira coluna, adicionar em todos os wells 20 µl de tampão no qual sua amostra a ser dosada está diluída. Na segunda coluna, adicionar em duplicata, o padrão: solução de BSA 1 mg/mL diluída 1:10, de acordo com o seguinte protocolo:

- 5 µl de padrão + 15 µl de tampão (0,5 µg)
- 10 µl de padrão + 10 µl de tampão (1,0 µg)
- 15 µl de padrão + 5 µl de tampão (1,5 µg)
- 20 µl de padrão (2,0 µg)

Fazer diluições seriadas em duplicata de sua amostra nas outras colunas, sempre mantendo o volume final de amostra de 20 µl. Recomenda-se fazer diluições na base de 2 ou de 10, ou mesmo repetir as mesmas diluições do padrão. Acrescentar a todos os wells 180 µl de Reagente de Bradford. Efetuar a leitura em leitor de ELISA a 600 nm.

Fazer a curva do padrão no Excel usando regressão linear e com a equação da reta calcular a quantidade de amostra e posteriormente a sua concentração. Usar somente as absorbâncias das diluições que se encontrarem dentro do limite mínimo e máximo imposto pelo padrão.

Equação da reta: $y = Bx + A$ Então, $x = y - A/B$

Sendo que y é a absorbância e o x é a quantidade de proteína

Colocar no eixo y as absorbâncias obtidas do padrão e no eixo do x colocar as quantidades: 0,5, 1, 1,5 e 2 µg. Após calcular a quantidade de proteína da amostra ($x = y - A/B$), calcular a concentração em mg/mL e multiplicar pelo fator de diluição.

7 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante descrito por Laemmli (1970). O gel de separação era constituído de 15 ou 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). As amostras foram misturadas ao tampão de amostra SDS-PAGE com redução e fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente, em placas de dimensão 10,0 x 8,0 x 0.8cm, à 100V, 24 mA, durante 3 horas. Após eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Comassie Blue por 45 minutos (25°C) e lavados em solução descorante até o desaparecimento da coloração de fundo.

8 - ELISA

A placa de ELISA foi sensibilizada por 16 horas a 4°C com 0,5 µg/poço dos antígenos diluídos em tampão carbonato. A placa foi então lavada 2 vezes com solução de lavagem (Materiais e métodos/item B) e bloqueada com solução bloqueio (Materiais e métodos/item B) por incubação a 37°C por 1 hora. Após lavar a placa 2 vezes com solução de lavagem; ela foi incubada com soro imune e soro pré-imune por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada 6 vezes com solução de lavagem e incubada com conjugado anti-IgG de coelho ou camundongo peroxidase diluído 1:10.000 em tampão de incubação por 1 hora a 37°C. A placa foi novamente lavada 6 vezes e foram adicionados 100 µl/poço de solução substrato (2 mg de OPD, 2 µl de H₂O₂ e 10 mL de tampão citrato) (Materiais e métodos/item B). A placa foi deixada 15-20 minutos no escuro e a reação foi interrompida com 20 µl/poço de H₂SO₄ diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 492 nm no aparelho "Titertek Multiscan plate spectrophotometer". Toda amostra é feita em duplicata.

9 - Western Blotting

As amostras de proteína de interesse foram fracionadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 μ m - SIGMA), sob corrente de 100 V 350 mA por 1 hora (Towbin e cols., 1979). As proteínas foram então submetidas ao reconhecimento do anticorpo como descrito por Guatimosin e cols. (2000). Resumidamente, ligações a sítios não específicos foram bloqueadas por 1h em PBS contendo 0,3% de Tween 20. As membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e incubadas por uma hora e meia em temperatura ambiente com soro imune de interesse. Três lavagens com PBST foram feitas e então o conjugado foi acrescentado na diluição adequada em PBS 1x. A membrana foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST e duas lavagens com PBS 1x a reação foi revelada pela adição do substrato da peroxidase contendo 0,5 mg/mL de diaminobenzidine e 0,25 mg/mL de 4-cloronaftol, 8% de metanol e 0,042% de H₂O₂ 30% ou 0,3 mg/mL de 4-cloronaftol, 20% de metanol e 75 μ l de H₂O₂ 30% em PBS 1x.

IV- Produção de soros e teste de potência

1- Imunização dos animais

1.1 – Imunização dos camundongos

Após coletar o soro pré-imune de 6 camundongos Swiss (fêmeas) de 5 semanas, estes foram injetados subcutaneamente com 10 μ g de veneno total de *Tityus serrulatus*, ou 20 μ g de proteínas recombinantes: TsTx-I₍₁₎ (mono), TsTx-I₍₂₎ (di) e TsNTxP/MBP ou PBS (controle negativo) emulsificado em adjuvante completo de Freund's (dia 1). Injeções subseqüentes foram feitas nos dias 21 e 35, com a mesma dose em adjuvante incompleto de Freund's. Foram administradas 3 injeções de reforço de 10 μ g (veneno), 20 μ g (TsNTxP/MBP) ou 30 μ g (TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎) de imunógeno com sete dias de intervalo entre elas nos respectivos animais. Sete dias após a última injeção, os animais foram sangrados por via intraorbital. O soro foi titulado por ELISA como

descrito abaixo. Mais uma dose reforço foi dada antes do desafio com o veneno do *T. serrulatus*.

1.2 – Imunização dos coelhos

Para este experimento foram utilizados coelhos (machos) da raça Nova Zelândia pesando aproximadamente 2 Kg e com cerca de 4 meses. Antes da primeira dose de imunógeno foi feita uma sangria para obtenção do soro controle pré-imune. Após coleta do soro pré-imune, os coelhos receberam 100 µg de imunógeno (veneno bruto, TsTx-I₍₁₎, TsTx-I₍₂₎) em adjuvante completo de Freund's (Sigma). As injeções foram aplicadas por via subcutânea em 4 pontos diferentes no dorso do animal (dia 1). Nas doses seguintes, nos dias 15 e 30, o adjuvante completo foi substituído pelo incompleto e a quantidade de imunógeno foi a mesma. Sete dias após a última dose, os coelhos foram sangrados e o soro foi titulado por ELISA. Foram ainda necessárias mais 4 injeções de reforço de 150 µg para atingirmos uma titulação adequada. Após uma semana da última dose o soro foi coletado e caracterizado por ELISA. No caso, do coelho imunizado com veneno total, as imunizações inicialmente foram feitas com hidróxido de alumínio (dia 1, 15 e 30 e 4 reforços), posteriormente eles foram imunizados mais 2 vezes com adjuvante incompleto de Freund's.

2 - Titulação dos soros dos animais

Placas de microtitulação (Falcon – Becton Dickinson) foram sensibilizadas durante 18 horas a 4°C com 100 µl/poço de uma solução 0,5 µg/poço de veneno total de *Tityus serrulatus* em tampão bicarbonato 0,02 M pH 9,6. Os soros dos camundongos e dos coelhos imunizados com o veneno total e as proteínas recombinantes foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Soros pré-imunes dos animais imunizados foram adicionados na placa como controle. Este ensaio foi conduzido como previamente descrito por Chavéz-Olórtegui e cols. (1991) e no item III-8 deste trabalho. A absorbância foi determinada a 492 nm com espectrofotômetro. Todas as medidas foram feitas em duplicatas.

3 – Determinação da DL₅₀

Foram utilizados 5 grupos de 8 camundongos (fêmeas) Swiss CF1 pesando entre 18 a 22 g com 4 a 5 semanas. A DL₅₀ do veneno de *Tityus serrulatus* foi determinada de acordo com Karber (1937). Resumidamente, cada grupo recebe uma quantidade de veneno e o fator de diluição é 1,2. Sendo assim, se o grupo 1 recebe 5,2 µg de veneno total de *T. serrulatus*, o grupo 2 recebe 5,2 µg x 1,2 (6,25 µg) e assim por diante. A dose de veneno é diluída em PBS/BSA 1%, volume final de 100 µl, que é injetado subcutaneamente nos camundongos. A contagem de mortos foi feita 24h após o desafio. A dose letal para matar 50% dos camundongos (DL₅₀) foi calculada pelo programa “PROBITOS”, cedido gentilmente pelo laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Química.

4 - Neutralização *in vitro*

Foram utilizados camundongos (fêmeas) Swiss CF1 pesando entre 18 a 22 g. A DL₅₀ do veneno de *Tityus serrulatus* foi determinada de acordo com Karber (1937) e com descrito anteriormente. Amostras do veneno (1 ou 2 DL₅₀) foram incubados durante 1 hora a 37°C com 100 ou 200 µl de soro dos coelhos imunizados. Após este tempo esta solução foi injetada via subcutânea em cada um dos camundongos dos grupos (cada um com 4 animais). O soro pré-imune também foi pré-incubado, nas mesmas condições, com o veneno. A contagem de sobreviventes foi feita 24h após o desafio.

5 - Capacidade de proteção após vacinação

Os camundongos imunizados no item IV-1.1 foram utilizados neste ensaio. Após o ciclo de imunizações, eles foram pesados para fazer o cálculo de quanto de veneno que seria usado. Os animais foram desafiados com 2 DL₅₀. Como os animais já eram adultos no início das imunizações, o acréscimo de peso será basicamente de gordura, e não massa corporal. Sendo assim, consideramos para os cálculos 60% do acréscimo do peso (veja exemplo abaixo). A contagem de sobreviventes foi feita 24 e 48 horas após o desafio.

Peso inicial = 20 g

Acréscimo do peso = 10 g

2 DL₅₀ = 12,14 µg/20 g de camundongo

60% do acréscimo = 6 g

Quantidade de veneno usada:

12,14 µg — 20 g de camundongo

x — 26g de camundongo

x = 15,78 µg

V – Análise dos dados

1 - Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas entre os diferentes grupos foram feitas usando o teste t-student com nível de significância de $p < 0,01$.

Resultados

Duas metodologias foram usadas para obter a sequência de nucleotídeos de toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*: a partir do DNA genômico e a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula deste escorpião. A primeira metodologia é mais usada quando se conhece a sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos da proteína que se quer obter e a segunda metodologia normalmente é usada para se obter sequências de novas proteínas.

Como as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos das toxinas TsTx e TsTx-I já foram descritas (Martin-Eauclaire e cols., 1992, 1994), primers foram construídos para sua obtenção a partir do DNA genômico, pois seria uma metodologia mais direcionada e rápida.

I - Obtenção do DNA das toxinas

1 - Obtenção dos DNAs das proteínas TsTx e TsTx-I do DNA genômico do escorpião *Tityus serrulatus*

O DNA genômico foi extraído do escorpião *Tityus serrulatus* e uma amostra foi corrida em gel de agarose 1% para quantificação e verificação da qualidade do DNA. Na Figura 19a podemos ver que o DNA genômico está com uma qualidade boa, sem apresentar arrastos, indicativo de DNA degradado, e sua concentração estimada foi de 0,1 µg/µl.

Foi feita uma padronização da PCR para amplificação das sequências da TsTx-I e da TsTx. O melhor resultado foi obtido diluindo o DNA genômico 1:50 e utilizando o tampão para Taq polimerase 1C. Sendo assim os DNAs foram amplificados utilizando 2 µl de DNA genômico diluído 1:50 e tampão 1C (Figura 19b). Os amplicons foram purificados (Figura 19c) e ligados no vetor pGEM.

Das colônias positivas, 10 de cada uma das ligações feitas foram selecionadas para a extração de plasmídeos. Os plasmídeos quantificados foram cortados com as enzimas específicas. Nenhum dos clones da TsTx e da TsTx-I foram cortados pelas enzimas Sal I e Hind III, respectivamente (Figuras 20 a e b). Esses clones foram cortados com a enzima Eco RI, que tem sítios

externos à região onde os DNAs estão inseridos. Dos clones da TsTx-I, cinco cortaram (Figura 20c) e dos clones da TsTx quatro cortaram (Figura 20d).

Os quatro clones da TsTx (3, 5, 8 e 11) e cinco clones da TsTx-I (1, 3, 5, 6, 7) foram seqüenciados. As seqüências de alguns clones, que tinham boa qualidade, mostraram que o DNA das proteínas foi clonado no vetor pGEM e que foram inseridos corretamente.

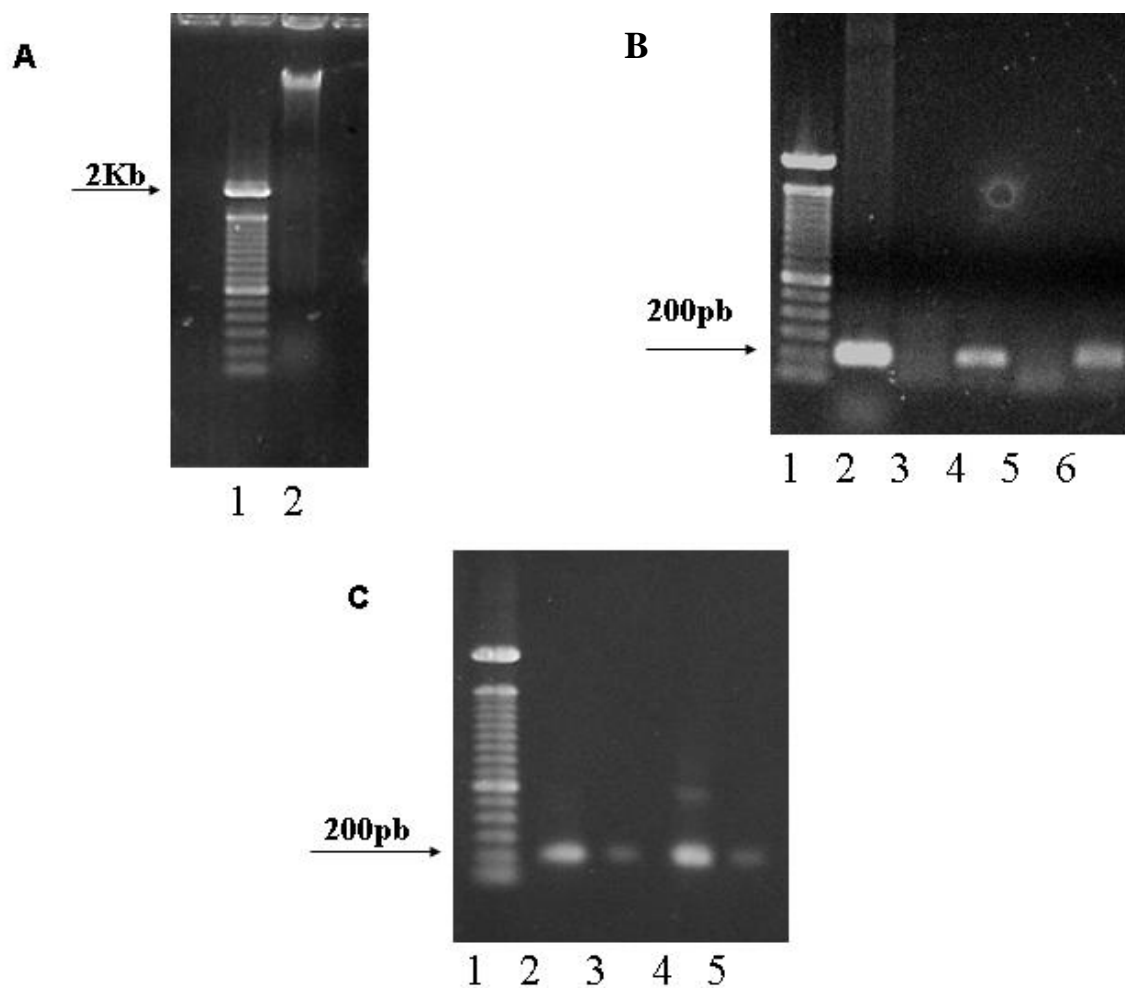


Figura 19 - Extração do DNA genômico e obtenção do DNA das toxinas.

Em todas as fotos dos géis, na canaleta 1 foi aplicado 1 μ g de padrão de 100 pb (Invitrogen). Em A, na segunda canaleta foi aplicado 10 μ l de DNA genômico. Em B, na canaleta 2 foi aplicado um controle positivo (DNA amplificado da TsNTxP), nas canaletas 3 e 4, temos controle negativo (todos reagentes, menos DNA) e produto da amplificação da TsTx e nas 5 e 6, controle negativo (todos reagentes, menos DNA) e produto da amplificação da TsTx-I, respectivamente. Em C, os amplicons da TsTx (canaletas 2 e 3) e da TsTx-I (canaletas 4 e 5) purificados.

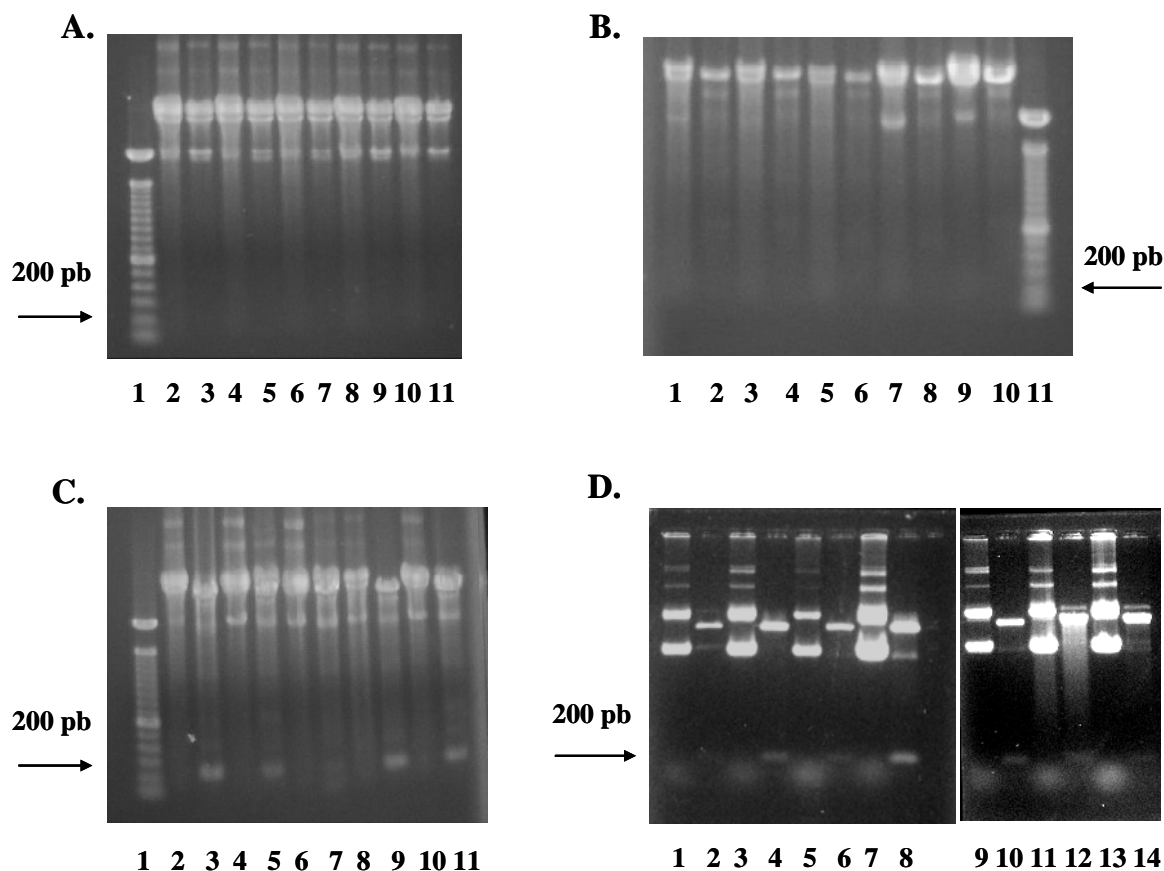


Figura 20 – Corte com enzima de restrição dos clones da TsTx e TsTx-I em pGEM. Em A, os clones 3, 5, 7, 8 e 11 da TsTx, com o plasmídeo não cortado (números pares) e cortado com Sal I (números ímpares). Em B, clones 1, 3, 5, 6 e 7 da TsTx-I, com o plasmídeo não cortado (ímpares) e cortado por Hind III (pares). Em C, clones 3, 5, 7, 8 e 11 da TsTx, com o plasmídeo não cortado (pares) e cortado com Eco RI (ímpares). Em D, os clones 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 9 da TsTx-I, com o plasmídeo não cortado (ímpares) e cortado com Eco RI (pares).

2 - Busca de DNAs de toxinas na biblioteca de DNAs da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

2.1- Excisão em massa da biblioteca

A biblioteca foi titulada e se verificou que não havia a necessidade de amplificá-la. Então partimos direto para a excisão em massa. Foram realizadas duas excisões: na primeira obtivemos 114 colônias e na segunda obtivemos 520 colônias. As primeiras 114 colônias foram submetidas a PCR de colônia, para verificar a existência ou não de inserto e para verificar o tamanho dos insertos. Como a PCR de colônia evidenciou amplicons em todas as colônias, decidimos extrair os plasmídeos das outras colônias e verificar o tamanho dos insertos por PCR normal com primers do vetor. Muitos clones tinham insertos de tamanho ideal (>200 pb) e todos foram seqüenciados.

2.2- Seqüenciamento e análise dos dados

Os 634 clones foram seqüenciados e geraram 920 cromatogramas. As toxinas de interesse imediato TsTx (Tityustoxina) e TsTx-I (Tityustoxina I) foram identificadas entre os primeiros 192 clones seqüenciados. A Figura 21 e 22 representam as seqüências obtidas e os resultados do BLASTx.

A

```

gg cac gag gaa caa tcg atc tga acg atg aaa gga atg atc ttg ttt att
                                M K G M I L F I

agc tgc tta ttg ctg atc ggc att gtc gta gaa tgt aaa gaa ggt tat ctc
S C L L L I G I V V E C K E G Y L

atg gat cac gaa ggt tgc aaa ctt agt tgc ttt atc aga cca tcg gga tac
M D H E G C K L S C F I R P S G Y

tgc ggc aga gaa tgc gga att aaa aag ggc tca tcg ggc tat tgc gcc tgg
C G R E C G I K K G S S G Y C A W

ccc gcg tgt tac tgc tac ggg ctt cca aat tgg gtg aaa gtt tgg gat aga
P A C Y C Y G L P N W V K V W D R

gcg acg aac aaa tgt ggc aaa aaa taa att tgt ttc gct gaa aat cct tta
A T N K C G K K -

caa atg aac tgt aat aag ttt ggc aaa aat aaa aaa atg ttc cct taa aaa

aaa aaa aaa aaa aaa

```

B

```

gi|312022|emb|CAA46982.1| Ts VII; beta-neurotoxin precursor [Tityus
serrulatus]
gi|102802|pir|S21158 neurotoxin TsVII precursor - Brazilian scorpion
gi|453106|gb|AAB29128.1| toxin gamma; toxin VII [Tityus serrulatus]
gi|401073|sp|P15226|SCX7_TITSE Toxin VII precursor (TsTX-VII) (Tityustoxin
VII) (Ts VII) (Toxin
II-11) (Toxin III-10) (Ts1) (Toxin gamma) (Toxin T2-IV)
Length = 84

Score = 192 bits (489), Expect = 2e-48
Identities = 84/84 (100%), Positives = 84/84 (100%)
Frame = +3

Query: 27 MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLM DHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWP 206
          MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLM DHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWP
Sbjct: 1  MKGMILFISCLLLIGIVVECKEGYLM DHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWP 60

Query: 207 ACYCYGLPNWVKVWDRATNKGKK 278
          ACYCYGLPNWVKVWDRATNKGKK
Sbjct: 61  ACYCYGLPNWVKVWDRATNKGKK 84

```

Figura 21 – Análise da sequência da TsTx-I obtida na biblioteca. Em A, sequência obtida no MegaBace; em negrito o peptídeo sinal e sublinhado os aminoácidos que sofrem modificações pós-traducionais. Em B, análise do Blastx.

A.

```

gg cac gag aat tac ttc att ctc ttg gtc gtc gtc tgc tta ttg acc gcg ggc
  H E N Y F I L L V V V C L L T A G

acg gag ggc aag aaa gac gga tac ccg gtg gaa tac gat aac tgc gcc tac
  T E G K K D G Y P V E Y D N C A Y

att tgc tgg aac tac gac aac gct tac tgc gat aag ctg tgc aaa gac aag
  I C W N Y D N A Y C D K L C K D K

aaa gcc gat agc gga tat tgt tac tgg gtt cac atc ctg tgc tac tgc tac
  K A D S G Y C Y W V H I L C Y C Y

ggg ctt ccc gat agc gaa ccg acc aag acc aac gga aaa tgc aaa tcc ggt
  G L P D S E P T K T N G K C K S G

aag aag taa acc agc ctc cta ttg atc cca gat ccg ccc tgg cgg ata aaa
K K -

tgt ttc tga aaa cca ttc ccg aaa taa aac tca tgc ctg caa aaa aaa aaa

aaa aaa a

```

B.

Alignments

Get selected sequences

Select all

Deselect all

☐ >[gi|546246|qb|AAB30413.1](#) Ts IV alpha-toxin precursor [Tityus serrulatus]
[gi|2144671|pir||NTSR4T](#) neurotoxin TsIV precursor - Brazilian scorpion (fragment)
[gi|1173395|sp|P45659|SCX4](#) **TITSE** Toxins IV/III/V precursor (Tityustoxin IV) (Ts IV) (TsIV)
 Length = 80

Score = 186 bits (473), Expect = 1e-46
 Identities = 80/80 (100%), Positives = 80/80 (100%)
 Frame = +3

Query: 24 LVVVCLLTAGTEGKKDGYFVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCKDKKADSGYCYVWHILCYC 203
 LVVVCLLTAGTEGKKDGYFVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCKDKKADSGYCYVWHILCYC
 Sbjct: 1 LVVVCLLTAGTEGKKDGYFVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCKDKKADSGYCYVWHILCYC 60
 Query: 204 YGLPDSEPTKTNGKCKSGKK 263
 YGLPDSEPTKTNGKCKSGKK
 Sbjct: 61 YGLPDSEPTKTNGKCKSGKK 80

Figura 22 – Análise da seqüência da TsTx obtida na Biblioteca. Em A, seqüência obtida no MegaBace; em negrito o peptídeo sinal e sublinhado os aminoácidos que sofrem modificações pós-traducionais. Em B, análise do Blastx.

Os 920 cromatogramas foram submetidos a análises bioinformáticas. Foi usado o pacote phred phrap consed via *script* phredPhrap para gerar as ESTs (etiquetas de seqüências expressas). Assim foram obtidas 910 ESTs, que foram filtradas com o cross-match para remoção do vetor e agrupadas com phrap. O comprimento médio das ESTs foi de 734 pares de bases (Figura 23). Das 910 ESTs, quinze representam vetor sem inserto (1,6%) e 4,4% são seqüências com menos de 200 pares de base.

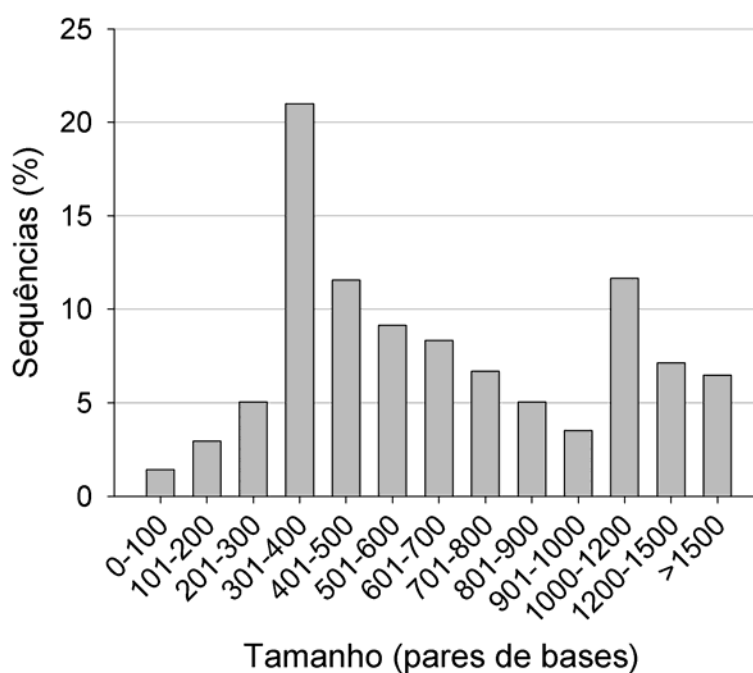


Figura 23 – Distribuição dos tamanhos das ESTs.

As ESTs foram anotadas com UniProt e GOA, 57% delas não apresentaram homologia ($e\text{-value} > 10^{-5}$) com nenhuma seqüência depositada nos bancos de dados usados, 43% apresentaram homologia com UniProt e destas 34% tinham anotação com GO (Figura 24a).

As 910 ESTs foram agrupadas pelo software phrap e geraram 400 *uniques* (grupos). Os *uniques* são o conjunto de *contigs* (agrupamento de seqüências de um mesmo transcrito - redundantes) e *singlets* (seqüências não redundantes). Os *uniques* obtidos foram igualmente anotados com UniProt e

GOA e 66% deles não apresentaram homologia. O restante (34%) apresentou homologia com UniProt e destas 29% tinham anotação com GO (Figura 24b).

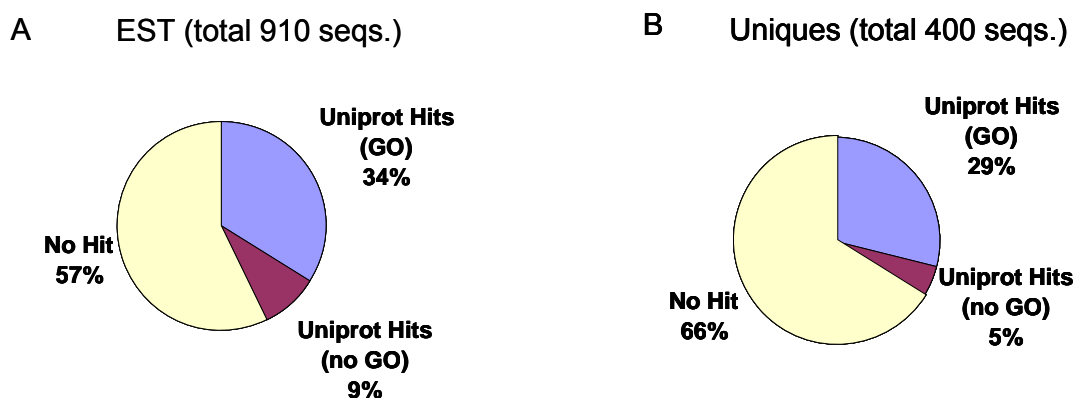
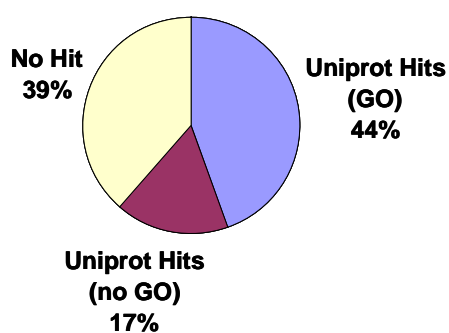


Figura 24 – Proporção relativa de cada categoria dos transcritos da biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *Tityus serrulatus*. Em A, a proporção dos transcritos e em B, a dos *uniques*. No Hit, inclui as ESTs ou *uniques* que não tem homologia com nenhuma sequência conhecida. UniProt Hits (GO), inclui os transcritos que tem homologia no UniProt e tinham anotação no GO. UniProt Hits (no GO), inclui os transcritos que tem homologia no UniProt e não tinham anotação no GO.

Os *uniques* se dividiram em 135 *contigs* e 265 *singlets*. Dos *contigs*, 39% das sequências não apresentaram homologia com proteínas já descritas nos bancos de dados usados e 61% apresentaram homologia com UniProt. Destas apenas 17% não tinham anotação no GO (Figura 25a). Para os *singlets*, temos 80% das sequências sem homologia e apenas 20% com homologia, sendo que 3% não tinham anotação com GO (Figura 25b).

A Contigs (total 135 seqs.)



B Singlets (total 265 seqs.)

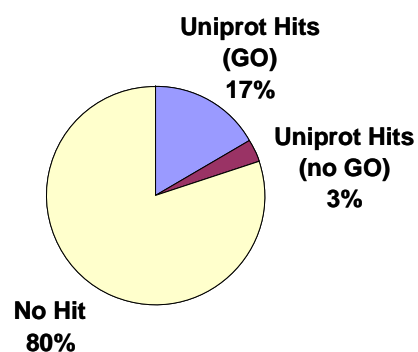


Figura 25 - Proporção relativa de cada categoria dos *Uniques*. Em A, a proporção dos *contigs* e em B, a dos *singlets*. No Hit, inclui as ESTs ou *uniques* que não tem homologia com nenhuma sequência conhecida. UniProt Hits (GO), inclui os transcritos que tem homologia no UniProt e tinham anotação no GO. UniProt Hits (no GO), inclui os transcritos que tem homologia no UniProt e não tinham anotação no GO.

As ESTs que apresentaram homologia com alguma sequência depositada no UniProt (309) foram anotadas com GOA para classificá-las funcionalmente com ontologias do GO: função molecular, processo biológico e componente celular. Uma mesma EST pode ser classificada em mais de uma ontologia do GO, sendo assim, 240 sequências foram classificadas como função molecular (FM), 242 como processo biológico (PB) e 150 como componente celular (CC). Das ESTs anotadas como FM (Figura 26a), 30% foram classificadas como inibidores de canais iônicos e aproximadamente 4% foram classificadas como atividade metaloendopeptidase. Já as ESTs anotadas como PB (Figura 26b), a maioria foi classificada como: patogênese (20%), defesa anti-bacteriana (20%) e resposta de defesa (10%). Quanto as ESTs anotadas em CC (Figura 26b), as principais categorias foram: região extracelular (16%), mitocôndria (10%), membrana (7%) e intracelular (5%).

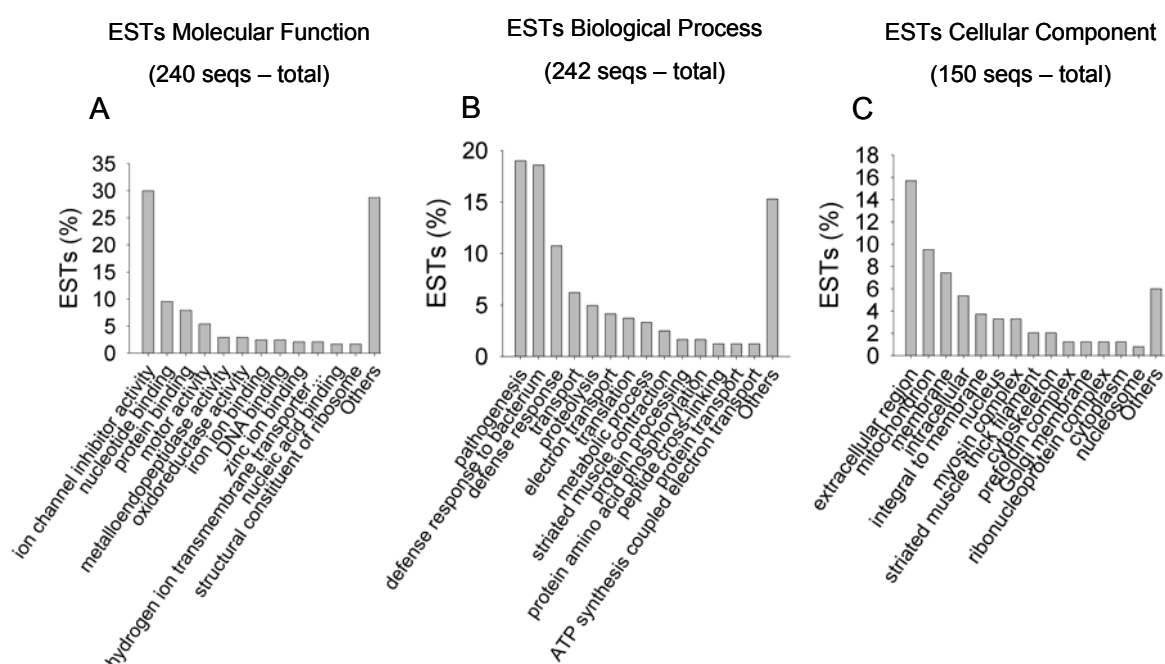


Figura 26 – Anotação das ESTs com Gene Ontology. Classificação funcional de todas as ESTs que tinham homologia com o UniProt. As abscissas mostram as categorias dentro de cada uma das três ontologias: função molecular, processo biológico e componente celular.

Das 400 *uniques*, 116 tinham anotação no GO. Destas, 98 seqüências foram classificadas como função molecular (FM), 88 como processo biológico (PB) e 66 como componente celular (CC). As categorias nas quais as *uniques* foram mais anotadas são praticamente as mesmas mais anotadas para as ESTs nas três ontologias (Figuras 26 e 27). Para função molecular e processo biológico houve uma redução, que possivelmente se deve a redundância encontrada na biblioteca.

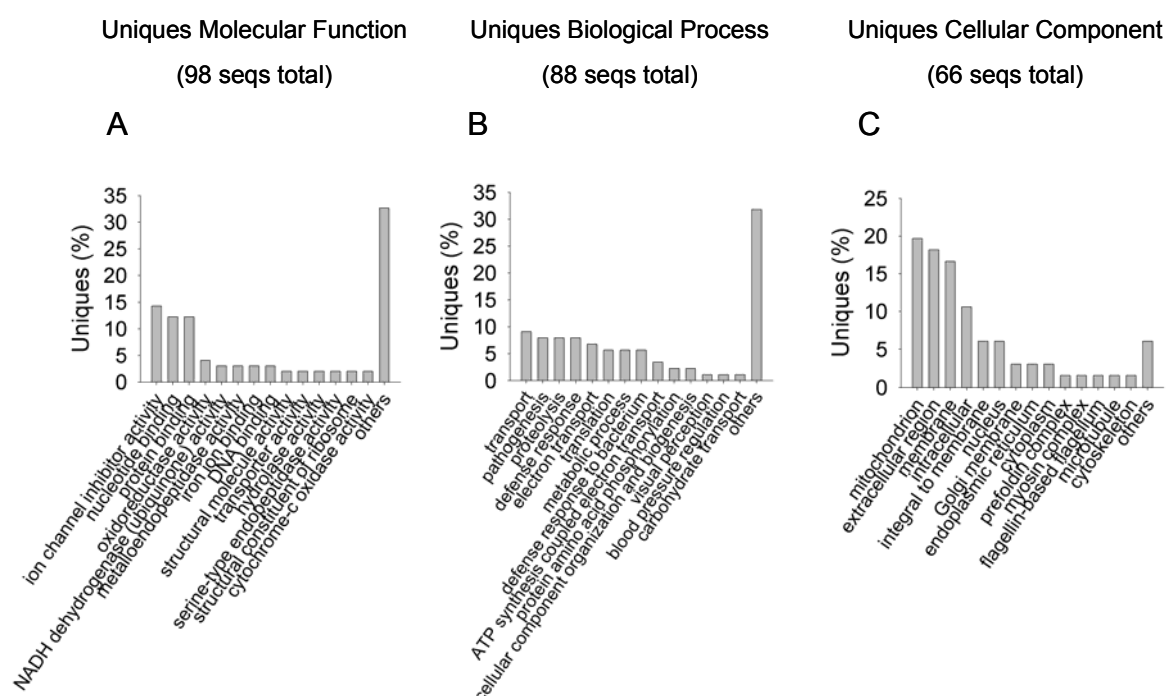


Figura 27 – Anotação das *Uniques* com Gene Ontology. Classificação funcional de todas as *uniques* que tinham homologia com o UniProt. As abscissas mostram as categorias dentro de cada uma das três ontologias: função molecular, processo biológico e componente celular.

Das *uniques* que tinham anotação com GO, fizemos uma busca manual pelas seqüências que tinham homologia com toxinas ou componentes do veneno (Tabela 4). Todas as seqüências homólogas a toxinas foram agrupadas em *contigs* e obtivemos 24 seqüências consensos descritas na tabela abaixo. Na anotação das *uniques* também anotamos com e-value liberado, para aumentar a chance de encontrarmos toxinas com pouca similaridade com as já descritas. Desta maneira obtivemos mais cinco *contigs* similares a toxinas.

Tabela 4 – Identificação dos transcritos que possuem homologia com toxinas ou componentes do veneno

Identificador interno	Identificador do UniProt	Descrição
esds_25082007 Contig2	AP4_TITCO	Putative antimicrobial peptide clone 4 precursor
esds_25082007 Contig4	KIK3_TITTR	Potassium channel toxin TtrKIK precursor
esds_25082007 Contig5	AP4_TITCO	Putative antimicrobial peptide clone 4 precursor
esds_25082007 Contig8	SCKP2_TITSE	Peptide TsPep2 precursor
esds_25082007 Contig15	KBX1_TITSE	Potassium channel toxin beta-KTx 1 precursor (Fragment)
esds_25082007 Contig18	Q45R47_BOOMI	MP5: Salivary gland metalloprotease
esds_25082007 Contig26	MMEL1_HUMAN	MMEL1, MELL1, MMEL2, NEP2: Membrane metallo-endopeptidase-like 1
esds_25082007 Contig32	SCX4_TITSE	Alpha-toxins precursor [Contains: Toxin-5 (Fragment)]
esds_25082007 Contig35	SCX7_TITSE	Toxin VII precursor
esds_25082007 Contig38	SCX4_TITSE	Alpha-toxins precursor [Contains: Toxin-5 (Fragment)]
esds_25082007 Contig40	KBX1_TITSE	Potassium channel toxin beta-KTx 1 precursor (Fragment)
esds_25082007 Contig48	Q45R47_BOOMI	MP5: Salivary gland metalloprotease
esds_25082007 Contig49	DISF_TRIFL	Zinc metalloproteinase flavoridin precursor
esds_25082007 Contig61	KA122_TITTR	Potassium channel toxin alpha-KTx 12,2
esds_25082007 Contig68	KA201_TITTR	Potassium channel toxin alpha-KTx 20,1
esds_25082007 Contig81	SCX2_TITST	Toxin II

esds_25082007 Contig102	SCKP2_TITSE	Peptide TsPep2 precursor
esds_25082007 Contig104	Q2PGH5_HAELO	met: Metalloprotease (Fragment)
esds_25082007 Contig116	SCX7_TITSE	Toxin VII precursor
esds_25082007 Contig119	AP9_TITCO	Anionic peptide clone 9 precursor
esds_25082007 Contig121	KBX1_TITSE	Potassium channel toxin beta-KTx 1 precursor (Fragment)
esds_25082007 Contig122	AP6_TITCO	Putative antimicrobial peptide clone 6 precursor
esds_25082007 Contig123	NTXP_TITSE	NTXP: Non-toxic protein NTxP precursor
esds_25082007 Contig124	AP6_TITCO	Putative antimicrobial peptide clone 6 precursor
esds_25082007 Contig125	A1YAC8_MESMA	LVP1a: Venom lipolysis-activating peptide alpha subunit
esds_25082007 Contig128	NTXP_TITSE	NTXP: Non-toxic protein NTxP precursor
esds_25082007 Contig129	KIK3_TITTR	Potassium channel toxin TtrKIK precursor
esds_25082007 Contig130	KB1_MESMA	Kb1: Peptide BmKb1 precursor
esds_25082007 Contig135	AP4_TITCO	Putative antimicrobial peptide clone 4 precursor

II – Construção dos cassetes

1 - Construção de proteínas em tandem

Nesta etapa, foram construídos três cassetes de expressão no pET 11a como está ilustrado na figura abaixo.

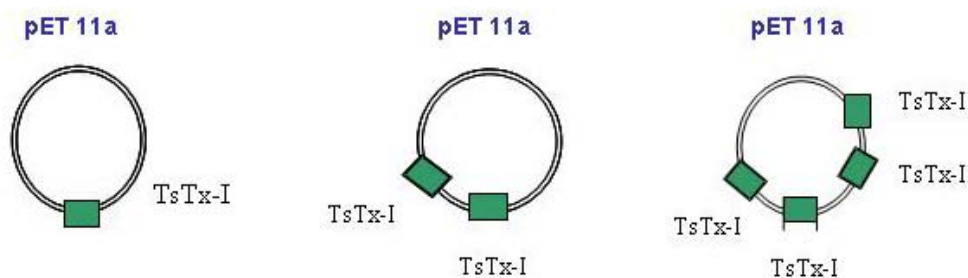


Figura 28 – Construção das proteínas recombinantes a partir da sequência da TsTx-I no vetor pET 11a.

1.1 - Clonagem do DNA da TsTx-I em pGEM

O DNA da TsTx-I foi amplificado do clone 1D6 da biblioteca (Figura 29a) utilizando-se os primers descritos na Figura 14. O DNA purificado (Figura 29b) foi ligado ao vetor pGEM. Das colônias positivas obtidas, oito colônias foram escolhidas para extração plasmidial. Esses clones foram cortados com a enzima de restrição Hind III e apenas 3 foram cortados e liberaram uma banda de 183 pb, tamanho esperado para o DNA da TsTx-I (dados não mostrados). Os clones A1, B1 e G1, positivos para o corte, foram seqüenciados. Os resultados de seqüenciamento mostraram que todos os clones tinham os insertos inseridos corretamente no vetor.

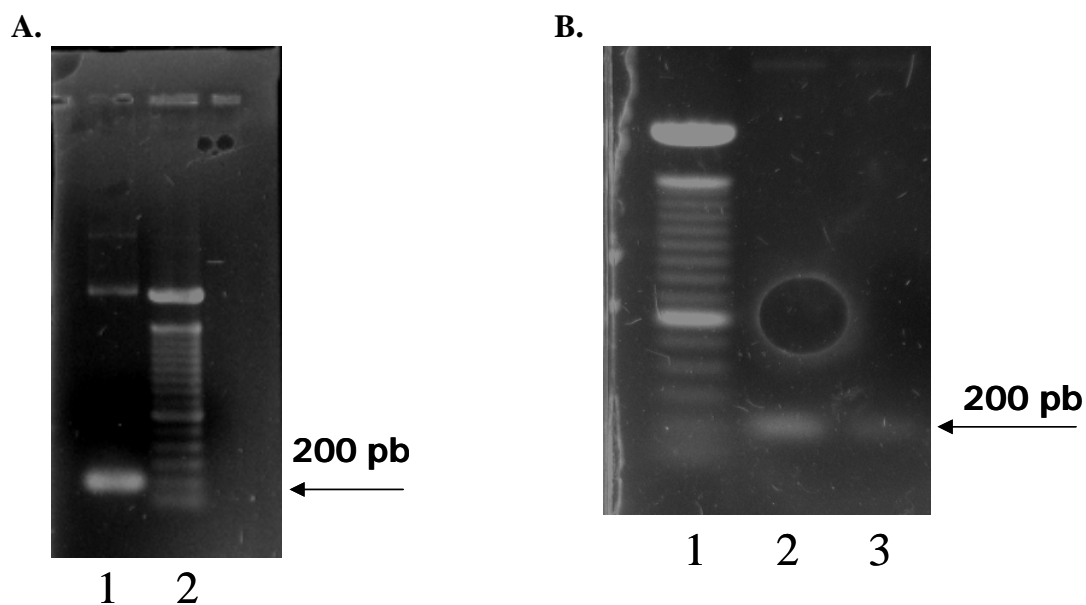


Figura 29 – Amplificação e purificação do DNA da TsTx-I do clone obtido da biblioteca. Em A, na canaleta 1 temos o produto de PCR da TsTx-I e na canaleta 2 temos o padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen). Em B, na canaleta 1 temos o padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen) e nas canaletas 2 e 3 temos 1ª e 2ª eluições da purificação do DNA da TsTX-I, respectivamente.

1.2- Subclonagem do DNA da TsTx-I no vetor pBluescript II KS-

O vetor pBluescript II KS- foi transformado quimicamente em bactérias DH5 α e essas foram submetidas à extração em larga escala do vetor. O plasmídeo extraído foi purificado com fenol. Controle de qualidade foi realizado através de cortes com as enzimas Xho I, Sal I, Hind III e Eco RI. O plasmídeo foi cortado por todas as enzimas testadas, indicando apresentar boa qualidade.

O clone A1 cortado com a enzima Hind III foi purificado pelo método da sílica (Figura 30a). O pBluescript foi cortado com Hind III e desfosforilado (Figura 30b). O DNA da TsTx-I purificado e o vetor desfosforilado foram ligados de acordo com item III.5.2. e transformados quimicamente em bactérias DH5 α .

Das colônias obtidas, apenas 6 colônias se apresentaram positivas (dados não mostrados). Essas colônias sofreram lise alcalina para extração dos seus plasmídeos.

Os clones 9, 11, 16, 17, 14 e 20 foram cortados com a enzima Hind III (Figura 31). Todos os clones foram cortados e apresentaram uma banda de aproximadamente 200 pb, com exceção dos clones 14 e 20 que tiveram duas bandas: uma de aproximadamente 200 pb e outra de 400 pb.

Todos os clones foram seqüenciados. Os clones 9, 11, 16 e 17 só tinham um DNA da toxina inserido no vetor de maneira correta como o esperado. Mas os clones 14 e 20, inesperadamente, continham dois DNAs da TsTx-I inseridos um atrás do outro, pelos seus sítios de restrição da Hind III (Figura 32). Essa ligação ocorreu por acaso.

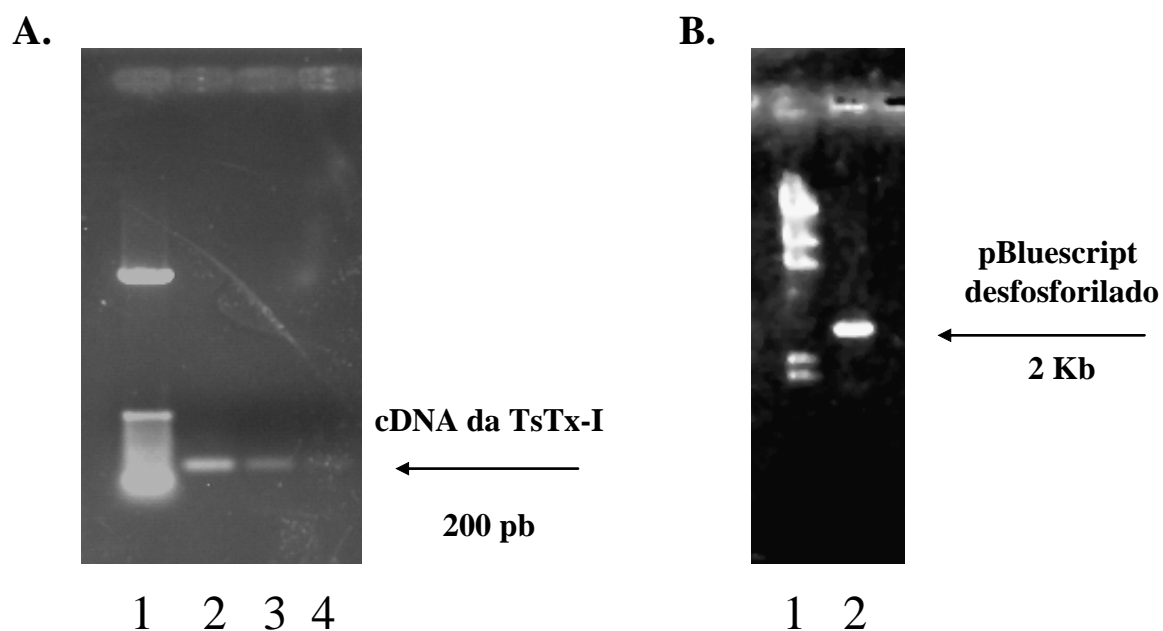


Figura 30 – Purificação do DNA da TsTx-I e desfosforilação do plasmídeo cortado. Em A, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 25 pb (Invitrogen). Nas canaletas 2, 3 e 4 temos o DNA da TsTx-I das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação. Em B, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular λ Hind (Gibco) e na canaleta 2 temos o plasmídeo cortado e desfosforilado.

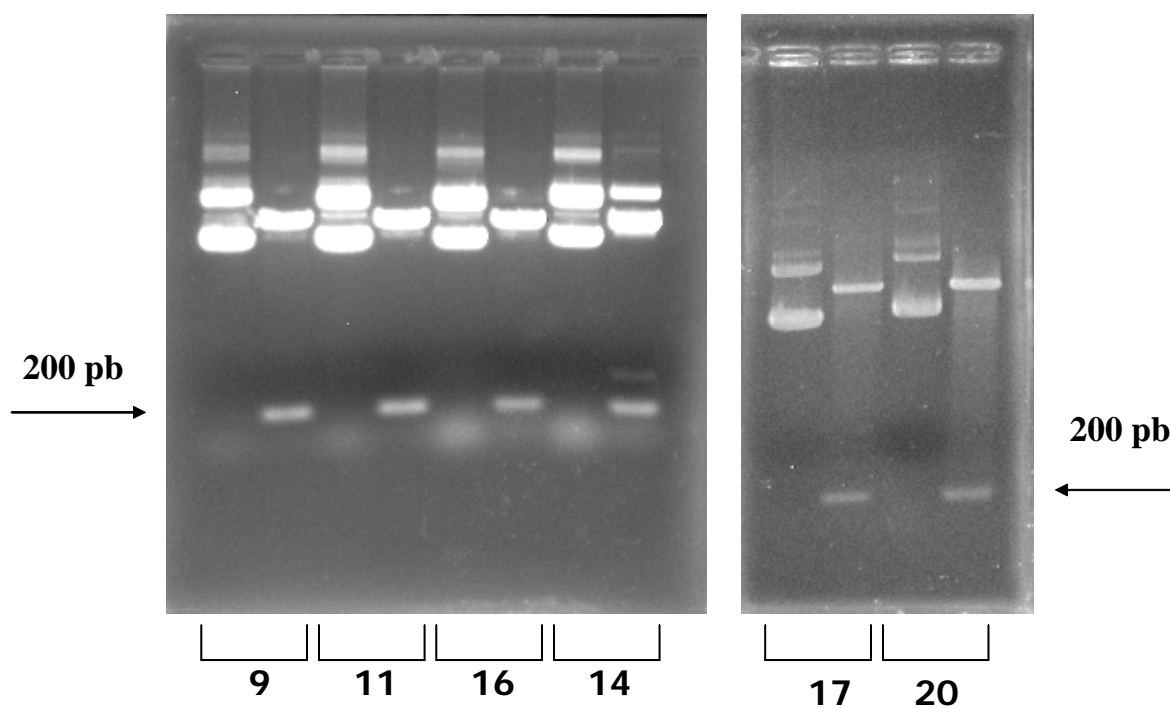


Figura 31 – Corte com enzima de restrição Hind III dos clones da TsTx-I clonados no pBluescript. Na figura, o plasmídeo não cortado sempre aparece primeiro e vem seguido do plasmídeo cortado. Abaixo do gel está indicado o clone correspondente.

A.

```

AAA GAA GGT TAT CTC AGT GAT CAC GAA GGT TGC AAA CTT AGT TGC TTT ATC AGA CCA
K   E   G   Y   L   S   D   H   E   G   C   K   L   S   C   F   I   R   P

TCG GGA TAC TGC GGC AGA GAA TGC GGA ATT AAA AAG GGC TCA TCG GGC TAT TGC GCC
S   G   Y   C   G   R   E   C   G   I   K   K   G   S   S   G   Y   C   A

TGG CCC GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA AAT TGG GTG AAA GTT TGG GAT AGA GCG
W   P   A   C   Y   C   Y   G   L   P   N   W   V   K   V   W   D   R   A

ACG AAC AAA TGT AAG CTT AAA GAA GGT TAT CTC AGT GAT CAC GAA GGT TGC AAA CTT
T   N   K   C   K   L   K   E   G   Y   L   S   D   H   E   G   C   K   L

AGT TGC TTT ATC AGA CCA TCG GGA TAC TGC GGC AGA GAA TGC GGA ATT AAA AAG GGC
S   C   F   I   R   P   S   G   Y   C   G   R   E   C   G   I   K   K   G

TCA TCG GGC TAT TGC GCC TGG CCC GCG TGT TAC TGC TAC GGG CTT CCA AAT TGG GTG
S   S   G   Y   C   A   W   P   A   C   Y   C   Y   G   L   P   N   W   V

AAA GTT TGG GAT AGA GCG ACG AAC AAA TGT A   T   N   K   C
K   V   W   D   R

```

B.

```

>gi|312022|emb|CAA46982.1| Ts VII; beta-neurotoxin precursor [Tityus
serrulatus]
gi|102802|pir|S21158 neurotoxin TsVII precursor - Brazilian scorpion
gi|453106|gb|AAB29128.1| toxin gamma; toxin VII [Tityus serrulatus]
gi|401073|sp|P15226|SCX7\_TITSE Toxin VII precursor (TsTX-VII) (Tityustoxin
VII) (Ts VII) (Toxin
    II-11) (Toxin III-10) (Ts1) (Toxin gamma) (Toxin T2-IV)
    Length = 84

Score = 146 bits (368), Expect = 2e-34
Identities = 61/64 (95%), Positives = 61/64 (95%)
Frame = +1

Query: 1 KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNK 180
        KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNK
Sbjct: 21 KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNK 80

Query: 181 CKLK 192
        C K
Sbjct: 81 CGKK 84

Score = 145 bits (367), Expect = 3e-34
Identities = 61/61 (100%), Positives = 61/61 (100%)
Frame = +1

Query: 190 KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNK 369
        KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNK
Sbjct: 21 KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRATNK 80

Query: 370 C 372
        C
Sbjct: 81 C 81

```

Figura 32 – Análise da sequência do clone 14 no programa Blastx. Em A, a sequência obtida pelo MegaBace, em azul está o sítio da enzima Hind III. Em B, resultado obtido pelo Blastx.

1.3 – Clonagem do DNA da TsTx-I₍₁₎ no pET 11a

Para esta clonagem, novos primers (descritos item I-1.4) foram construídos para a inserção do sítio da Bam HI no fragmento de DNA da TsTx-I (Figura 33). O clone 16 (pBluescript+TsTx-I₍₁₎) foi utilizado como DNA molde para esta amplificação.

Foi feita uma padronização da PCR para amplificação da sequência da TsTx-I com os novos primers. A melhor amplificação foi obtida quando a temperatura de anelamento era 58/54°C (5 ciclos a 58°C e 25 ciclos a 54°C) e o tampão usado era o 1C (Figura 34a).

O DNA amplificado e purificado (Figura 34b) foi ligado ao vetor pGEM. Os plasmídeos das colônias positivas obtidas foram extraídos. Eles foram passados em colunas com resina Sephacryl S-400 para retirar impurezas, após o tratamento eles foram cortados com Bam HI e apenas 3 deles não liberaram a banda esperada de 183 pb (Figura 34c). Todos os clones foram seqüenciados, mostrando que apenas um clone não continha inserto.

O clone 31b foi escolhido para a ligação no vetor pET. Os dois plasmídeos foram cortados com Bam HI. O pET teve suas pontas cortadas desfosforiladas e o fragmento de DNA da TsTx-I foi purificado pelo método, “freeze squeeze” (Figura 35). Da ligação resultaram várias colônias e destas 8 foram positivas. Os plasmídeos extraídos das colônias positivas foram analisados por PCR, mostrando que todos os clones amplificaram o fragmento de DNA de interesse (Figura 36a). O seqüenciamento confirmou o resultado da PCR (Figura 36b).

5' 3'

GGG CCC CCC CTC GAG GTC GAC GGT ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT ----- AAC AAA TGT AAG CTT GAT ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GGA

5' GGA TCC ATC GAT AAG CTT AAA GAA 3'

3' 5'

CCC GGG GGG GAG CTC CAG CTG CCA TAC CTA TTC GAA TTT CTT CCA ----- TTG TTT ACA TTC GAA CTA TAG CTT AAG GAC GTC GGG CCC CCT

3' TTG TTT ACA TTC GAA CTA TAG CTT AAG 5'

3' TTG TTT ACA TTC GAA CTA ACT CCT AGG 5'

5' GGA TCC TCA ATC AAG CTT ACA TTT GTT 3'

PRIMERS

pET TsTx-I Forward 1 5' GGA TCC ATC GAT AAG CTT AAA GAA 3'

pET TsTx-I Anti-senso 1 5' GGA TCC TCA ATC AAG CTT ACA TTT GTT 3'

Figura 33 – Construção dos primers para a clonagem da TsTx-I₍₁₎ no pET 11a. A sequência do pBluescript está representada pelas letras em preto, a da TsTx-I em vermelho e o códon terminador em verde. As letras realçadas pela cor amarela representam o sítio de restrição da enzima Hind III e em azul o sítio de restrição da enzima Bam HI

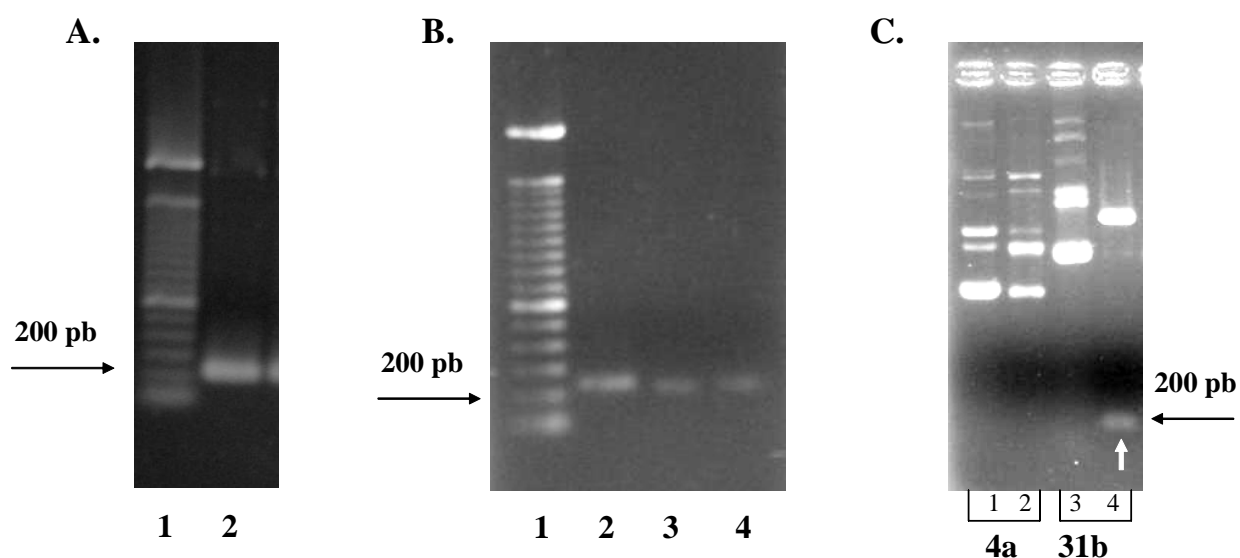


Figura 34 – Amplificação e purificação do fragmento de DNA TsTx-I₍₁₎ e verificação da clonagem. Em A, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen); na canaleta 2 temos o DNA da TsTx-I amplificado. Em B, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen); nas canaletas 2, 3, 4 temos o DNA da TsTx-I das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação. Em C, temos os clones 4a não cortado e cortado nas canaletas 1 e 2; e o clone 31b não cortado e cortado, nas canaletas 3 e 4, respectivamente. A seta branca indica o fragmento liberado.

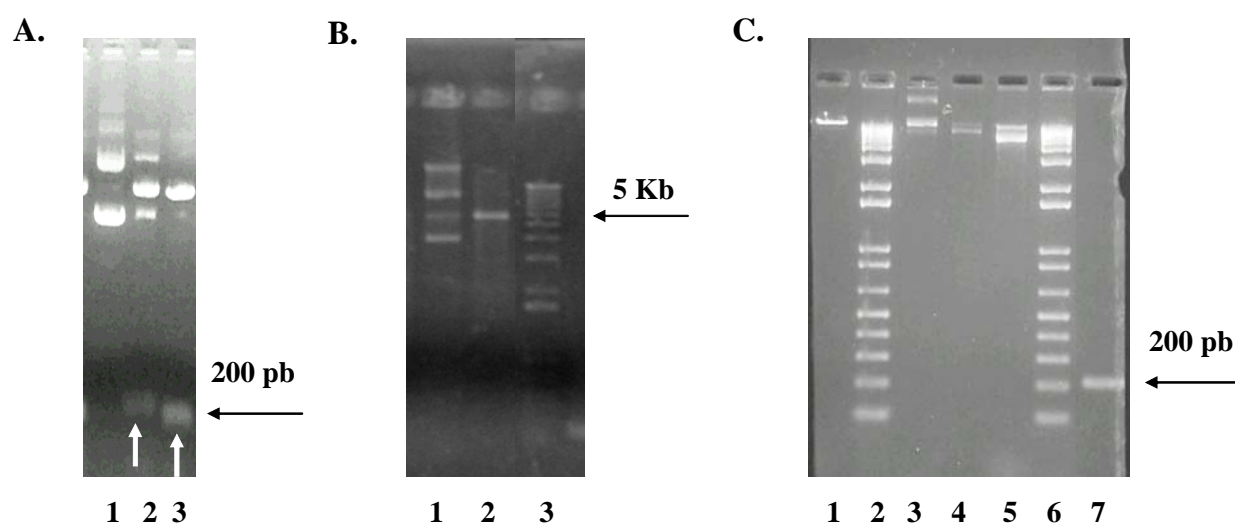
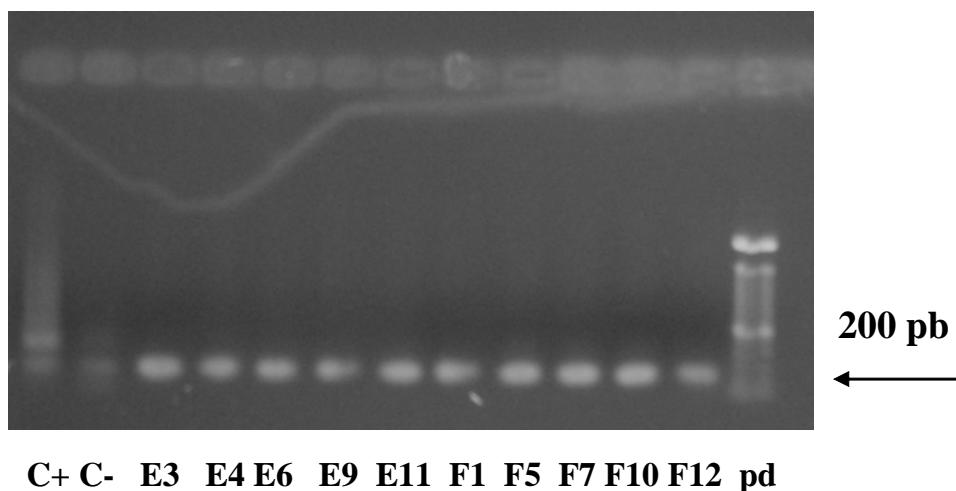


Figura 35 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I₍₁₎ no vetor pET 11a. Em A, na canaleta 1, 2 e 3 temos o clone 31b não cortado, cortado com Bam HI e cortado com Hind III, respectivamente. As setas brancas indicam os fragmentos liberados pelo corte. Em B, na canaleta 1 e 2 temos o vetor pET 11a não cortado e cortado com Bam HI, respectivamente; na canaleta 3 temos padrão de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). Em C, temos na canaleta 1, 100 ng do padrão λ íntegro (Gibco); nas canaletas 2 e 6 temos o padrão 1 Kb plus (Invitrogen); nas canaletas 3, 4 e 5 temos o vetor pET não cortado, cortado com Bam HI e desfosforilado, respectivamente; na canaleta 7 temos o DNA da TsTx-I₍₁₎ purificado.

A.



B.

```

>F04_well F04 EKThais2701_23032007 Run01 Cimarron 3.12 665
GGNGTANCGCGCGCAGANCGGTGCATGAAAAGGAGATGGCGCCCAACAGTC
CCCCGGCACGGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGA
GCCCCAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
GCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCC
GGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTAT
AGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTTGTTTA
ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAA
TGGGTCGC GGATCCATCGAT AAGCTTAAGAAGGTTATCTCAGTGATCAC
GAAGGTTGCAAACTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAC
GAGAATGCGGAATTAAANAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGC
GCTGTTACTGCTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTCTGGGATAGAGC
GACGAACAAATGT AACGCTTGATATCTGA GGATCCGGCTGCTAACAAAGC
CCGAAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCA
ATAACCCCTTGCGGGCCTCTAAACGGCGTCTTGAGGGGGTTTACACANGG
CTGAACAGTGCAGGAAGTATATACCGGAATATCCCCGCAAGAAGCCCNNG
CACAAGTTACCCGGGCACTAAACCCAAAGCCCTAATGGCTTACCAGGCAT
CCAAGCGGTCTGCAACGGCTGGCCCGACGGATGACGATTGGAGCCGCATG
GACAAATTNCATAACACACGGGGGACTGACACGGCCGTCNANCACAANT
TA

```

Figura 36 – Confirmação da ligação TsTx-I₍₁₎ no pET. Em A, a PCR dos clones obtidos a partir da ligação; os controles positivo (C+) e negativo (C-), o nome dos clones e o padrão (pd) de 25 pb (Invitrogen) estão indicados. O controle positivo é o produto da amplificação do DNA da TsTx-I clonado em pGEM e o controle negativo é a reação de PCR sem DNA. Em B, o seqüenciamento do clone E4. Os sítios de restrição da Hind III estão sublinhados de verde e os da Bam HI estão sublinhados de vermelho.

1.4 – Montagem da TsTx-I₍₂₎

Esta etapa foi facilitada pela clonagem ao acaso de duas cópias do DNA da TsTX-I no sítio de restrição Hind III do vetor pBluescript. Então foi necessário, apenas, inserir o sítio de restrição da enzima Bam HI no fragmento de DNA e posterior clonagem no pET 11a.

Os primers utilizados para a clonagem do DNA de 1 cópia (Figura 33) foram também usados nesta etapa e a reação de PCR também teve que ser padronizada. Neste caso, a padronização apresentou maiores dificuldades técnicas porque os primers amplificavam tanto 1 cópia quanto 2 cópias, originando 2 principais bandas de 200 e 400 pares de bases, além de outras acima da banda de 400 pb.

Vários testes foram feitos até se obter o melhor resultado. A estratégia que melhor funcionou, consistia de iniciar a PCR com 20 vezes menos DNA e 10 vezes menos primers, dez ciclos eram feitos assim, isto foi feito para tentar diminuir amplificações inespecíficas. Depois acrescentava mais Taq e primers nas concentrações normais. Sendo assim, a amplificação da banda de 400 pb era mais favorecida do que a de 200 pb (Figura 37a).

O produto da melhor amplificação foi aplicado em um gel de agarose 1% e corrido por tempo suficiente para as duas bandas se separarem o máximo possível para cortamos o fragmento de 400 pb do gel sem contaminação com a banda de 200 pb ou outras bandas inespecíficas.

O fragmento de 400 pb foi purificado (Figura 37b) e inserido em dois vetores de fácil clonagem: Topo TA e pGEM. Cinco colônias positivas de cada ligação foram submetidas à lise alcalina para extração de seus plasmídeos. Os clones foram purificados com Sephacryl S-400 e depois cortados com a enzima Bam HI (Figura 37c). Todos plasmídeos cortados liberam um fragmento do tamanho esperado (400 pb) e foram seqüenciados. Os clones 24, 43b, e 11b apresentaram seqüências de boa qualidade revelando que a clonagem tinha sido realizada com sucesso.

O clone 43b foi escolhido para a clonagem no pET. Ele foi cortado com Bam HI, purificado e ligado ao pET cortado e desfosforilado (Figura 38). Desta ligação resultaram várias colônias, as positivas foram submetidas à extração plasmidial. Os plasmídeos foram analisados por PCR e todos os clones

amplificaram uma banda de 400 pb, tamanho esperado para o inserto clonado (Figura 39a). Todos os clones foram seqüenciados e confirmaram o resultado obtido pela PCR (Figura 39b).

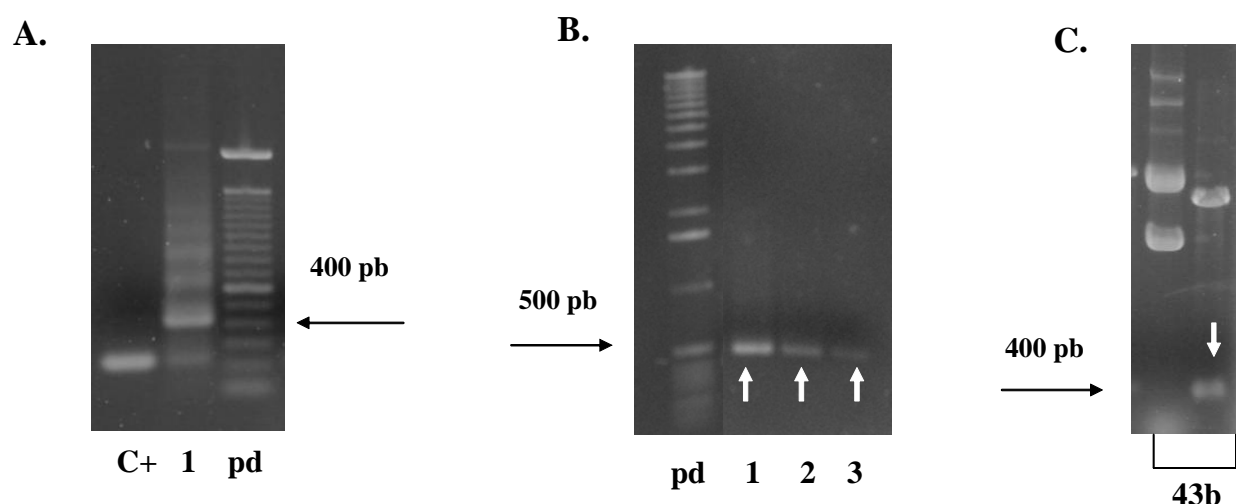


Figura 37 – Clonagem da TsTx-I₍₂₎ nos vetores de fácil clonagem. Em A, na canaleta 1, temos o controle positivo da reação de PCR (amplicon da TsTx-I); na canaleta 2 temos o produto da amplificação do clone 14; na canaleta 3 temos padrão de massa molecular (pd) de 100 pb (Invitrogen). Em B, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 1 Kb plus (Invitrogen); nas canaletas 2, 3, 4 temos o DNA da TsTx-I₍₂₎ das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação. Em C, temos o clone 43b não cortado e cortado, respectivamente. As setas brancas indicam a banda de DNA obtida.

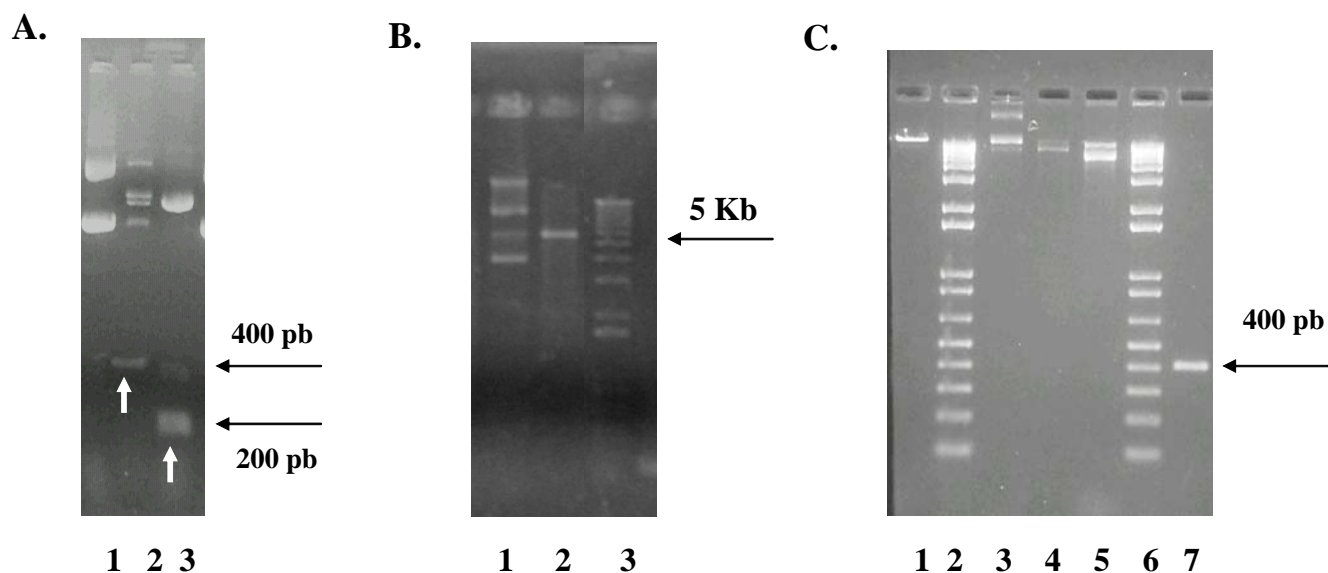
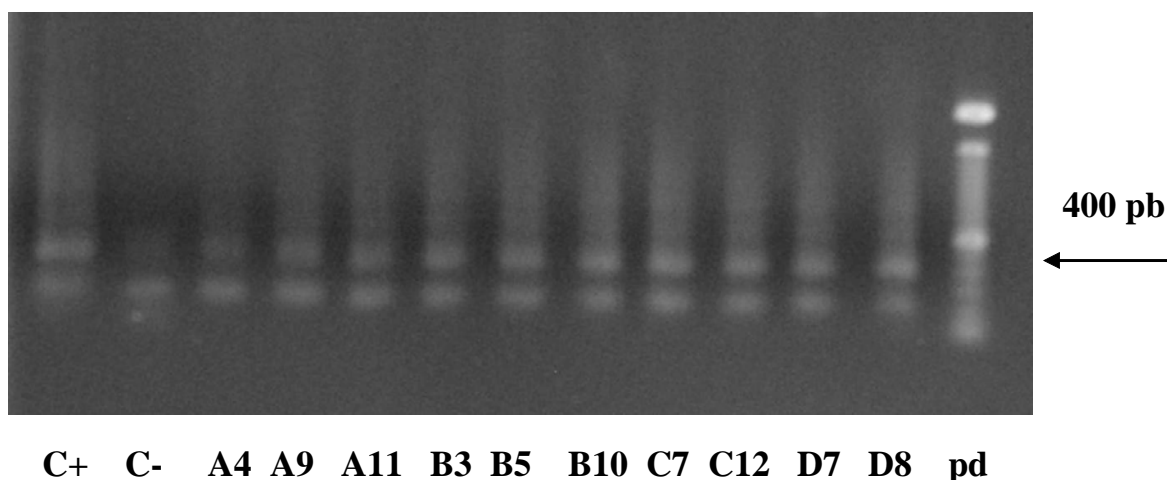


Figura 38 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I₍₂₎ no vetor pET 11a. Em A, na canaleta 1, 2 e 3 temos o clone 43b não cortado, cortado com Bam HI e cortado com Hind III, respectivamente. As setas brancas indicam os fragmentos liberados. Em B, na canaleta 1 e 2 temos o vetor pET 11a não cortado e cortado com Bam HI, respectivamente; na canaleta 3 temos padrão de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). Em C, temos na canaleta 1, 100 ng do padrão λ íntegro (Gibco); nas canaletas 2 e 6 temos o padrão 1 Kb plus (Invitrogen); nas canaletas 3, 4 e 5 temos o vetor pET não cortado, cortado com Bam HI e desfosforilado, respectivamente; na canaleta 7 temos o DNA da TsTx-I₍₂₎ purificado.

A.



B.

```

>A08 well1 A08 barbaraEK23_311006 Run01 Cimarron 3.12 730
AGAGACGCGCGCAGAAAGTGTGANCATGCAAGGAGATGGGCCAACAGTCCC
CCGGACACGGGGCCTGCCACCATAACCCACAGCCGAAACAAGCGCTCATGA
GCCCCAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAG
GCGCCAGCAACCTGCACCTGTGGCGCCGGTGACTGCCGGCCAACGATGCG
TCCGGCGTAGAGGATCGAAGAATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTC
ACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTCTAGAAATAATTTT
GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACA
GCAAATGGGTCGC GGATCCATCGATAAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTG
ATCACGAAGGTTGCAAACTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGC
GGCAGAGAATGCGGAATTA AAAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGACCTGGC
CCGCGTGTTACTGTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGA
GCGACGAACAAATGT AAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGG
TTGCAAACTTAGNTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAA
TGCGGAATTA AAAAAGGGCTCAATCGGGCTATTTGCGACCTGGACCGAGTG
TAACTGNTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTNNGGATAGAGCGACG
GAACAAATGT AAGCTTGATATCTGA GGATCCAGGGCTGCTTAACAAAGCC
CGGCAAAGGAAGCTGAGTTGGGCTGGATGACAACCGTGAGCAATAACTTA
AGACATNAACCCNTTGGGAGGGGAGACCNCTAAAAAACAGGAGTCCTCAGA
ACNAGGAGGACACAAAAGGCNNNAAGGAGAGGAACATCATAACAGNAA
AAATCCCGAAAAAAGCCCAGGAAAAAACAGGGANTACCAAAGCTAAANC
ACTACAAGACATTACANGGNGAACAGAGAGACCAGANGAANACAGATAA

```

Figura 39 – Confirmação da ligação TsTx-I₂ no pET. Em A, a PCR da ligação; os controles positivo (C+) e negativo (C-), o nome dos clones e o padrão (pd) de 25 pb (Invitrogen) estão indicados. O controle positivo é o amplicon do clone 14 e o negativo é a reação da PCR sem DNA. Em B, o seqüenciamento do clone A4. Os sítios de restrição da Hind III estão sublinhados de verde e os da Bam HI estão sublinhados de vermelho.

1.5 – Montagem da TsTx-I₍₄₎

A primeira etapa deste item foi a construção de um fragmento de DNA com 4 cópias do DNA da TsTx-I. Para isto, foi inserido no pBluescript que já continha 2 cópias da toxina (clone 14) mais duas cópias. Primers contendo o sítio de restrição da Eco RI e seqüências das extremidades N- e C-Terminal da TsTx-I foram desenhados e construídos para amplificar as duas cópias da toxina e inseri-las no clone 14 no sítio da Eco RI (Figura 40).

A reação de PCR foi padronizada e o mesmo problema do item anterior se repetiu: os primers amplificavam 2 bandas, uma de 200 pb e outra de 400 pb (banda de interesse). As mesmas estratégias foram testadas, com resultados similares. E do mesmo modo, o melhor produto de amplificação (Figura 41a) foi usado para obtermos a banda de 400 pb que foi purificada (Figura 41b) e ligada nos vetores de clonagem Topo TA e pGEM usando os mesmos métodos.

Os plasmídeos das colônias positivas foram extraídos, purificados em Sephacryl S-400 e cortados com a enzima Eco RI. Dentre os clones que liberaram um fragmento do tamanho esperado, o clone 38b foi escolhido para a montagem (Figura 41c).

Os plasmídeos (38b e 14) foram cortados com Eco RI. O clone 14 teve suas pontas desfosforiladas e a banda de interesse liberada do corte do clone 38b foi purificada (Figura 42). Foi feita a ligação, após análise obtivemos cinco clones positivos (clone A6, B1, B9, B12 e C8 – Figura 43). Todos eles foram seqüenciados e confirmamos que o fragmento de interesse foi clonado com sucesso.

5' 3'

CCC CTC GAG GTC GAC GGT ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT -- AAC AAA TGT AAG CTT -TsTx-I- AAG CTT GAT ATC GAA TTC CTG CAG CCC G

5' GAA TTC ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT 3'

3' 5'

GGG GAG CTC CAG CTG CCA TAC CTA TTC GAA -TsTx-I- TTC GAA TTT CTT CCA --- TTG TTT ACA TTC GAA CTA TAG CTT AAG GAC GTC GGG

3' TTG TTT ACA TTC GAA CTA TAG CTT AAG 5'

5' GAA TTC GAT ATC AAG CTT ACA TTT GTT 3'

PRIMERS

TsTx-I₍₄₎ Forward 5' GAA TTC ATC GAT AAG CTT AAA GAA GGT 3'

TsTx-I₍₄₎ Anti-senso 5' GAA TTC GAT ATC AAG CTT ACA TTT GTT 3'

Figura 40 – Construção dos primers para a clonagem da TsTx-I₍₂₎/Eco no clone 14. A sequência do pBluescript está representada pelas letras em preto e a da TsTx-I em vermelho. As letras realçadas pela cor amarela representam o sítio de restrição da enzima Hind III e em cinza o sítio de restrição da enzima Eco RI

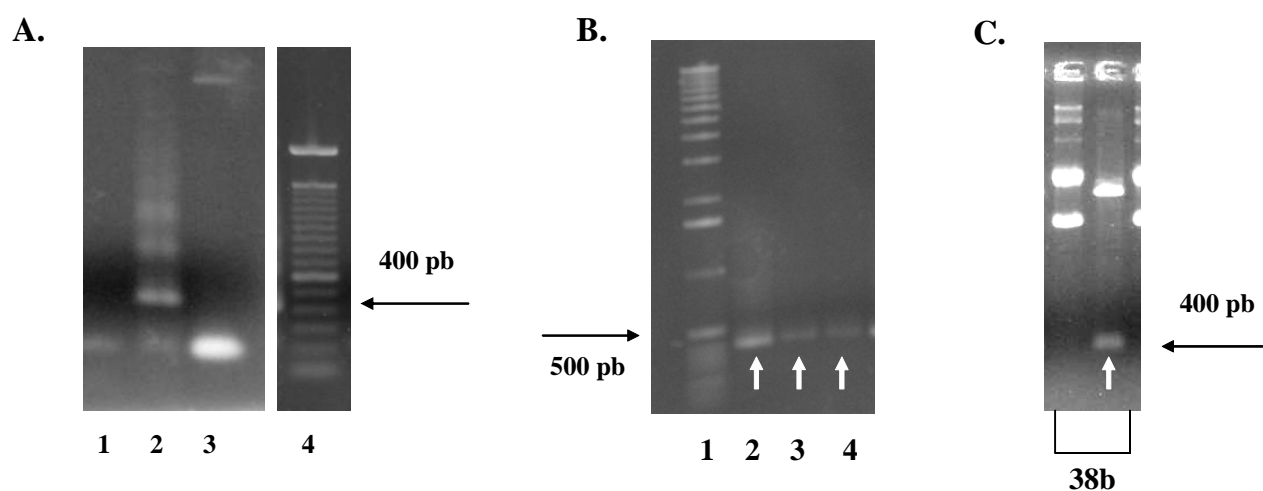


Figura 41 – Clonagem da TsTx-I₍₂₎ (Eco) nos vetores de fácil clonagem. Em A, na canaleta 1, temos o controle negativo da reação (todos reagentes, com exceção do DNA); na canaleta 2 temos o produto amplificação; na canaleta 3 temos o controle positivo da reação de PCR (amplicon da TsTx-I); na canaleta 4 temos padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen). Em B, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 1 Kb plus (Invitrogen); nas canaletas 2, 3, 4 temos o DNA da TsTx-I₍₂₎ (Eco) das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação. As setas brancas indicam a banda de DNA obtida. Em C, temos o clone 38b não cortado e cortado, respectivamente. A seta branca indica o fragmento liberado

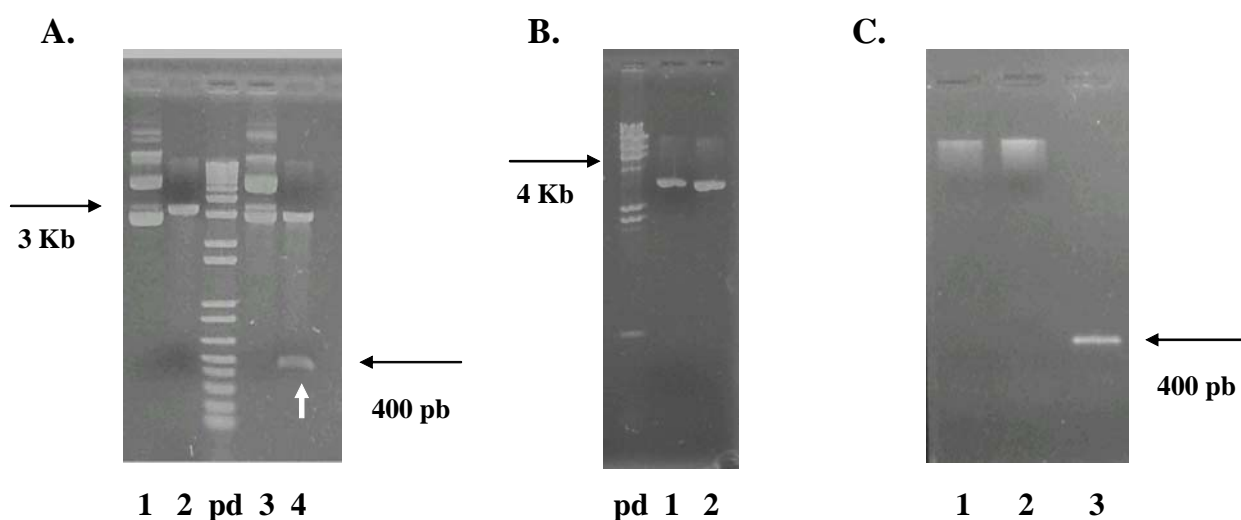


Figura 42 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I₍₂₎ (Eco) no clone 14. Em A, nas canaletas 1 e 2 temos o clone 14 não cortado e cortado com Eco RI, respectivamente; nas canaletas 3 e 4 temos o clone 38b cortado e não cortado com Eco RI; o padrão usado foi 1 Kb plus (Invitrogen). A seta branca indica o fragmento de DNA liberado. Em B, na canaleta 1 e 2 temos o vetor 14 cortado e cortado e desfosforilado, respectivamente; o padrão de massa molecular utilizado foi o λ Hind (Gibco). Em C, temos na canaleta 1 e 2 o padrão λ íntegro (Gigco) nas concentrações de 100 e 200 ng, respectivamente; na canaleta 3 temos o DNA da TsTx-I₍₂₎ (Eco) purificado.

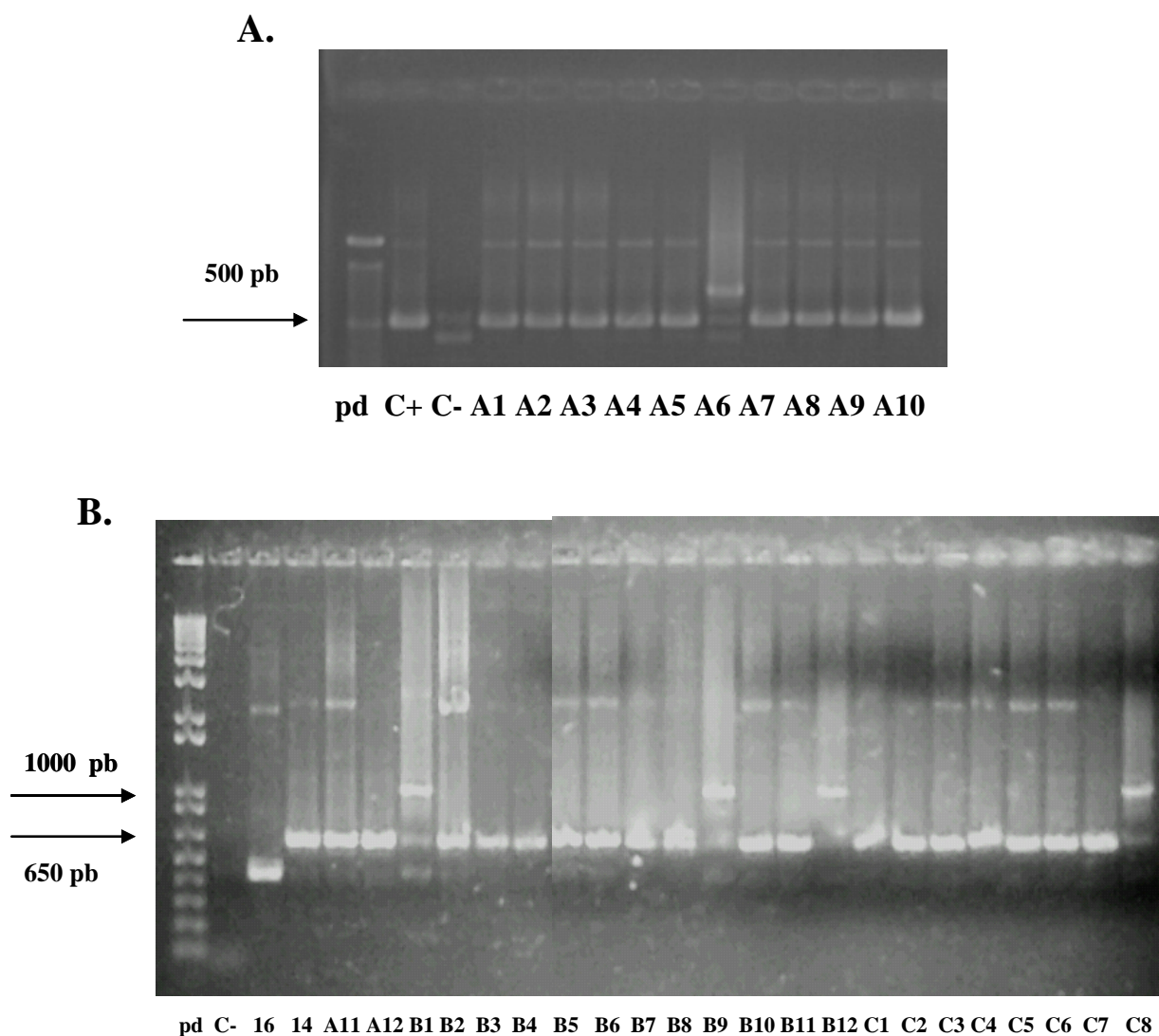


Figura 43 – PCR para confirmação da ligação da TsTx-I₍₂₎ (Eco) no clone 14. Em A, temos os produtos da PCR dos clones de A1 a A10. O controle positivo é o amplicon do clone 16 e o negativo é a reação de PCR sem DNA. O padrão de massa molecular utilizado é o 100 pb (Invitrogen). Em B, temos os produtos da PCR dos clones A11 a C8. O controle negativo é a reação de PCR sem DNA. Os produtos da amplificação do clone 16 e do clone 14 foram utilizados como controles positivos. O padrão de massa molecular utilizado é o 1 Kb plus (Invitrogen).

O clone 38A6 foi escolhido para continuarmos com as próximas etapas. Novos primers foram construídos para inserirmos o sítio de restrição da enzima Bam HI no fragmento de DNA com 4 cópias de TsTx-I para sua posterior clonagem no vetor de expressão pET 11a.

Visto os problemas encontrados nas outras clonagens, decidimos construir novos primers que anelasse no vetor, pois se o primer contivesse alguma seqüência da TsTx-I, mesmo que pequena, poderíamos ter amplificações inespecíficas. Na Figura 44, podemos ver como foi feita a construção deste primers.

Vários testes foram feitos para padronizar esta nova amplificação e o melhor procedimento foi usado. Sendo assim, utilizamos o produto da amplificação com o primers F1/R1, utilizando a temperatura de anelamento de 58/54°C, para a clonagem no pGEM (Figura 45a e b).

Obtivemos várias colônias e 10 foram selecionadas para a extração plasmidial e corte com Bam HI. Os clones 4.2, 4.3 e 4.10 cortaram, mas não liberaram fragmento; o clone 4.5 cortou e liberou um fragmento de tamanho menor do que o esperado; os outros clones liberaram o fragmento de tamanho esperado (Figura 45c). Todos os clones foram seqüenciados, os clones 4.1, 4.4, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 apresentavam o fragmento com 4 cópias clonado de maneira correta no vetor, clone 4.5 tinha 2 cópias e os outros não tinham o inserto clonado.

O clone 4.1 foi cortado com Bam HI, o fragmento liberado foi purificado e ligado ao vetor pET cortado e desfosforilado (Figura 46). Vinte clones foram selecionados e analisados. Três deles liberaram um fragmento do tamanho esperado (Figura 47) e tinham o fragmento clonado corretamente. Na Figura 48 podemos ver o seqüenciamento de um dos clones positivos, o clone 11.



Figura 44– Construção dos primers para a clonagem da TsTx-I₍₄₎ no pET 11a. A fita 5'-3' do pBluescript está representada pelas letras em preto e a fita 3'-5' em cinza, a da TsTx-I em vermelho e o códon terminador em verde. As letras realçadas pela cor amarela representam o sítio de restrição da enzima Hind III, em verde o sítio da Eco RI, em azul o sítio de restrição da enzima Bam HI. As letras sublinhadas representam o sítio de restrição da enzima Bam HI

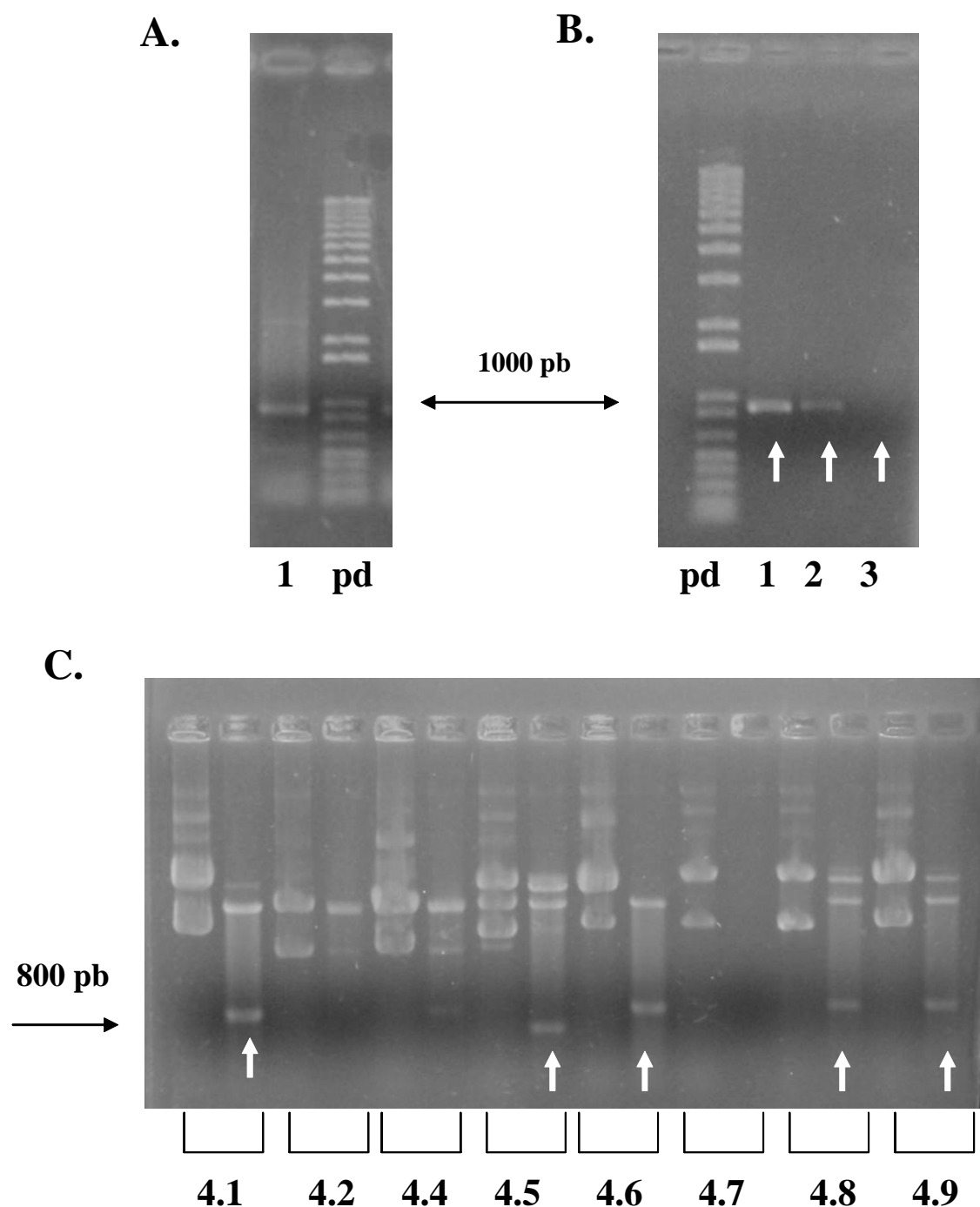


Figura 45 – Clonagem da TsTx-I₍₄₎ em pGEM. Em A, na canaleta 1, temos o produto da amplificação da TsTx-I₍₄₎; o padrão de massa molecular usado foi o 1 Kb plus (Invitrogen). Em B, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 1 Kb plus (Invitrogen); nas canaletas 2, 3, 4 temos o DNA da TsTx-I₍₄₎ das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação. Em C, temos os clones 4.1, 4.2, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 não cortado e cortado, respectivamente. As setas brancas indicam o fragmento de DNA liberado.

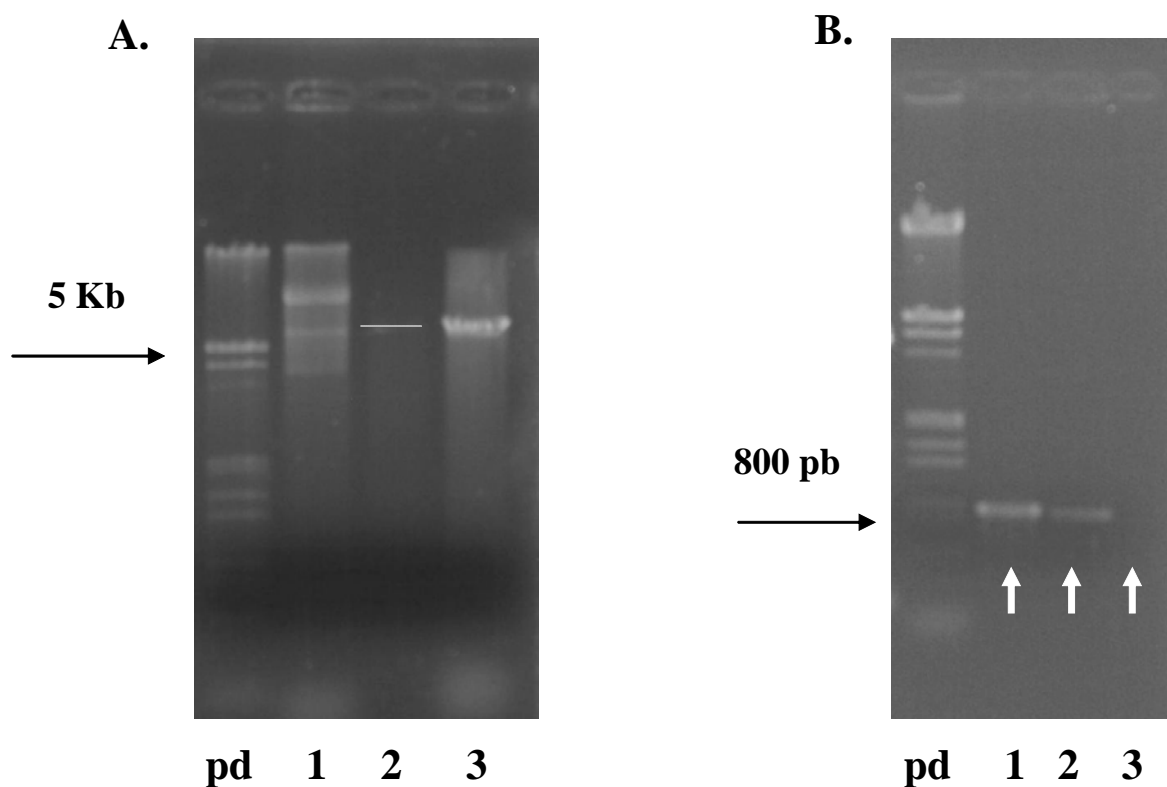


Figura 46 – Preparo para subclonagem do DNA da TsTx-I₍₄₎ no pET 11a.

Em A, nas canaletas 1, 2 e 3 temos o pET 11a não cortado, cortado com Bam HI e cortado e desfosforilado, respectivamente; o padrão usado foi 1 Kb (Invitrogen). Em B, na canaleta 1, 2 e 3 temos o DNA da TsTx-I₍₄₎ das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação de DNA. O padrão usado foi 1 Kb plus (Invitrogen). As setas indicam o fragmento de DNA purificado.

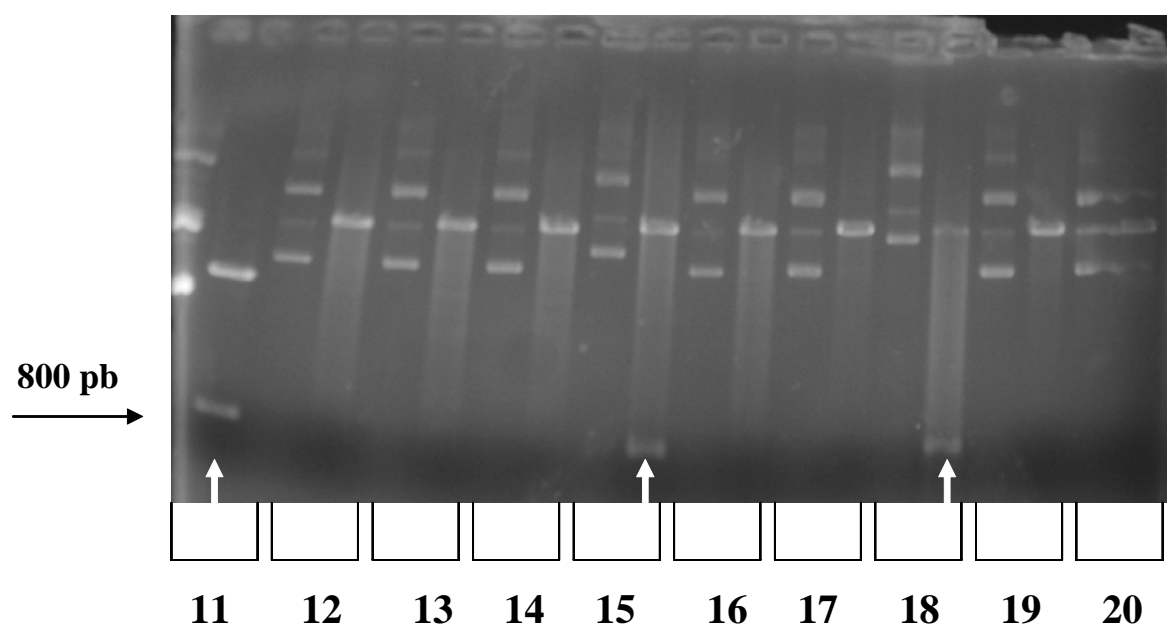


Figura 47 – Corte com enzima de restrição para confirmação da ligação da TsTx-I₍₄₎ em pET. Alguns clones foram cortados com Bam HI. Os números indicam os clones, os plasmídeos estão na ordem: não cortado e cortado. As setas brandas indicam os fragmentos de DNA liberados.

```

>F12 well F12 EKThais2701_23032007 Run01 Cimarron 3.12 777
AAGGGGGGCGCCGAGTCGCATGCTCCGGCCGCATGGCGGCGCGGGAATCGA
TTGGATCCAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCAC
TAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTAT
CGATAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTA
GTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTAAA
AAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTTACTGCTACGGGCT
TCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAGCTTA
AAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAGTTGCTTTATC
AGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTAAAAAGGGCTCATC
GGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTTACTGCTACGGGCTTCCAAATTGGG
TGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAGCTTGATATCGAATTC
ATCGATAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCT
TAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTA
AAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTTACTGCTACGGG
CTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAAGC
TTAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACCTTAAGTTGCTTT
ATCAGACCATCGGGA TACTGNCGGGGCCAGAGAAATGGCGGGAATTTCAAC
AAAGGGGGGCTCCAATAACCGGGGGACATATTTNCCCCATTGTACCCCC
ACCACAAATTGTATAACACAAAGCAAACACACGGGNCTTTATCCACAAA
TCGGGGGGGAGAAAAAACTTTATNGGACAAACAAAACACACACCAAACA
CACAAATTTTAAAACCTCGAACAAACCAAACN

```

Figura 48 – Seqüenciamento da TsTx-I₍₄₎ em tandem no vetor pET 11a.
Seqüenciamento do clone 11. Os sítios de restrição da Hind III estão sublinhados em verde e o sítio da Bam HI está em vermelho.

2 - Construção da proteína quimérica

Nesta etapa, foi construída uma proteína recombinante no pET 11a utilizando as seqüências da proteína TsNTxP e toxinas TsTx e TsTx-I, como está ilustrado na figura abaixo.

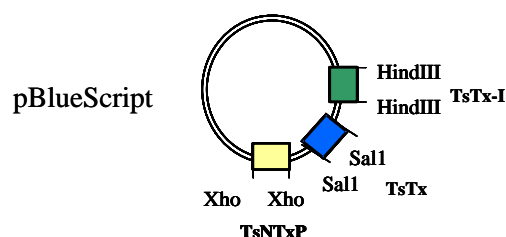


Figura 49 – Construção da proteína recombinante quimérica no vetor pBluescript.

2.1 - Clonagem do DNA da TsNTxP (amplificado do pMAL) no vetor pGEM

O fragmento de DNA da TsNTxP foi amplificado do vetor pMAL já subclonado com a seqüência de nucleotídeos desta proteína (Figura 50a).

O DNA amplificado foi purificado (Figura 50b) e ligado no vetor pGEM como descrito na metodologia. As colônias positivas foram submetidas à extração plasmidial. Os clones obtidos foram cortados com a enzima Xho I e todos plasmídeos sofreram corte e liberaram uma banda de 189 pb (tamanho esperado – Figura 50c). Destes clones, quatro foram seqüenciados. Todos os clones apresentaram o DNA da TsNTxP clonado na janela de leitura correta.

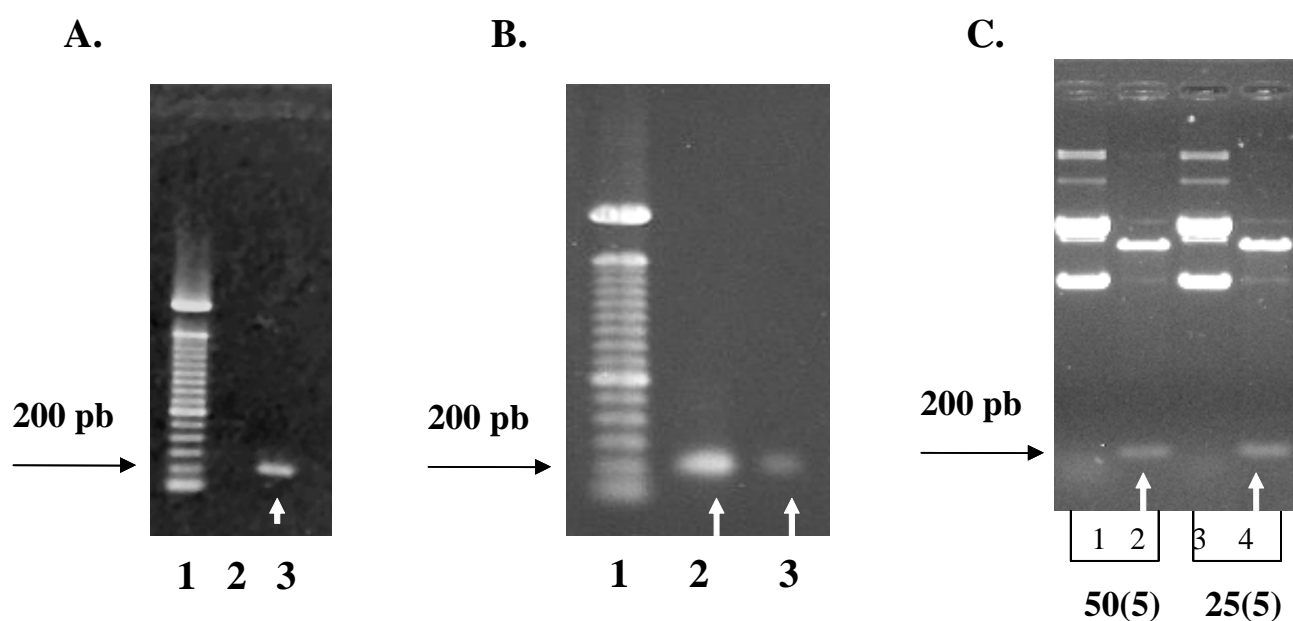


Figura 50 – Amplificação, purificação e clonagem do DNA da TsNTxP em pGEM. Em A, na canaleta 1 temos o padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen); na canaleta 2 controle negativo da reação (todos reagentes, menos DNA) e na canaleta 3 temos o produto de amplificação do DNA da TsNTxP. Em B, na canaleta 1, temos padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen); nas canaletas 2 e 3 temos o DNA da TsNTxP das 1^a e 2^a eluições da purificação de DNA. Em C, temos dois clones obtidos da ligação cortados com a enzima Xho I, na ordem não cortado e cortado. As setas brancas indicam os fragmentos de DNA obtidos.

2.2 - Subclonagem do DNA da TsNTxP no vetor pBluescript contendo o DNA da TsTx-I

O clone 50(5) contendo o DNA da TsNTxP (em pGEM) e os clones 14 (2 cópia) e 16 (1 cópia) contendo o DNA da TsTx-I (em pBluescript) foram cortados com a enzima Xho I (Figura 51a). O inserto do clone 50(5) foi purificado pela sílica e os clones 14 e 16 foram desfosforilados (Figura 51b). A ligação e a transformação foram feitas de acordo com metodologia já descrita. Das colônias obtidas, as positivas foram submetidas à extração plasmidial e os plasmídeos foram cortados com Xho I, os clones 14(1), 14(2), 14(3), 14(6), 14(17) e 16(4), 16(5), 16(24), 16(29), 16(36) e 16(43) foram cortados e liberaram uma banda de 189 pb, que é o tamanho esperado para o DNA da TsNTxP (Figura 51c). Todos os clones foram seqüenciados e verificou-se que o DNA da TsNTxP foi clonado corretamente.

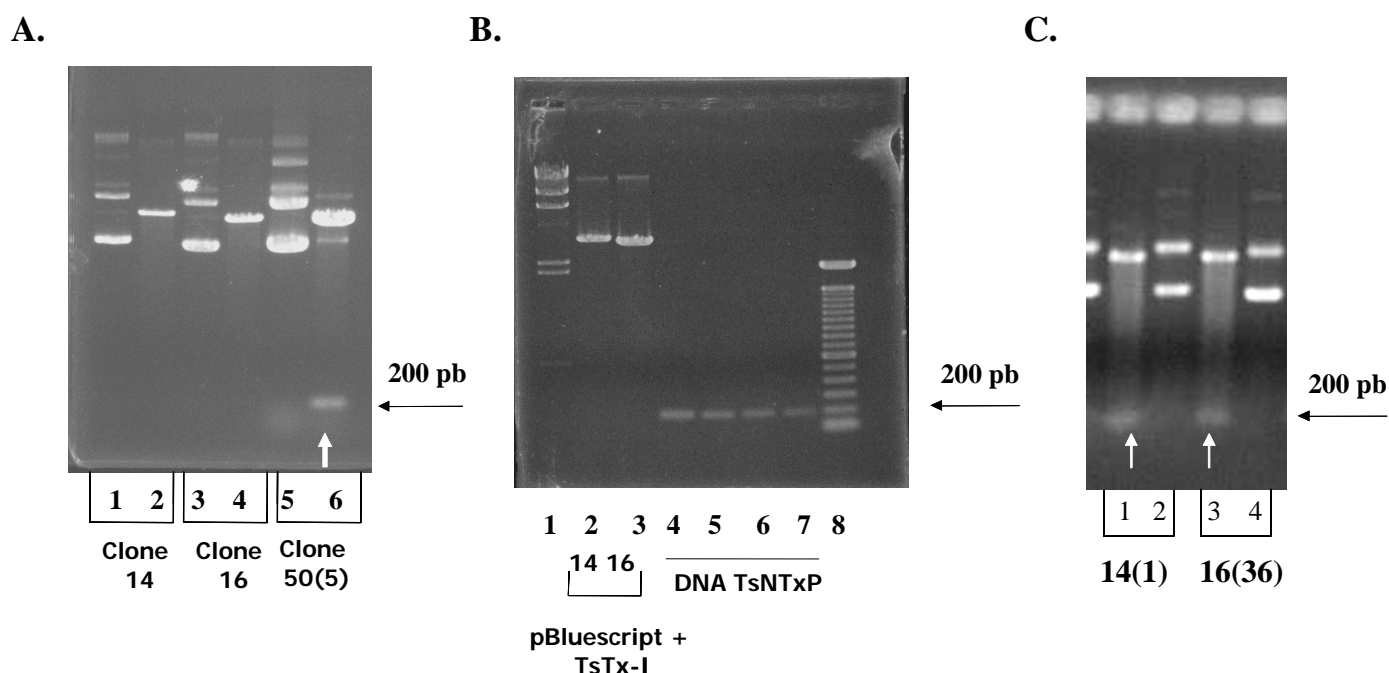


Figura 51 – Clonagem do DNA da TsNTxP nos clones 14 e 16 da TsTx-I (di e mono). Em A, nas canaletas 1 e 2, clone 14 não cortado e cortado com Xho I, respectivamente; nas canaletas 3 e 4, clone 16 não cortado e cortado com Xho I, respectivamente; nas canaletas 5 e 6, clone 50(5) não cortado e cortado com Xho I, respectivamente. Em B, nas canaletas 1 e 8, padrões de massa molecular λ Hind (Gibco) e 100 pb (Invitrogen), nas canaletas 2 e 3 clones 14 e 16 cortados com Xho I e desfosforilados, respectivamente, nas canaletas 4, 5, 6 e 7, DNA da TsNTxP purificado pelo método da sílica, 1^a e 2^a eluições da purificação de DNA, de duas purificações diferentes, respectivamente. Em C, primeiro o plasmídeo cortado e depois plasmídeo não cortado pela enzima Xho I, nas canaletas 1 e 2 temos o clone 14(1) e nas canaletas 3 e 4 temos o clone 16(36). Abaixo estão os nomes dos clones e as setas brancas indicam os fragmentos de DNA obtidos.

2.3 - Clonagem do DNA da TsTx em pGEM

O DNA da TsTx foi amplificado do clone 3E9 da biblioteca (Figura 52a). Este DNA amplificado foi purificado pelo método da sílica e ligado ao vetor pGEM (Figura 52b). As colônias positivas tiveram seus plasmídeos extraídos e cortados com a enzima de restrição Sal I. Todos os clones cortaram e liberam um fragmento de 192 pb (Figura 52c). Eles foram seqüenciados e a clonagem correta foi confirmada.

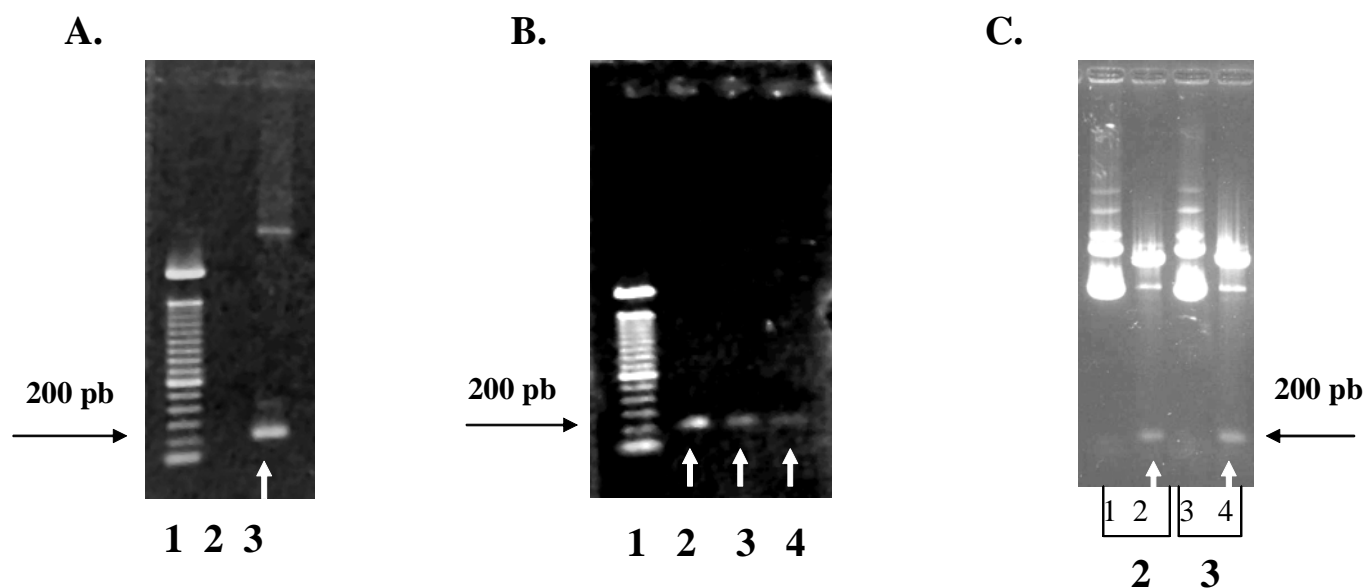


Figura 52 – Clonagem do DNA da TsTx no pGEM. Em A, na canaleta 1 temos o padrão de massa molecular de 100 pb (Invitrogen), na canaleta 2 controle negativo da reação (todos reagentes, menos DNA) e na canaleta 3 temos o produto da amplificação do DNA da TsTx. Em B, na canaleta 1, 2 e 3 temos o DNA da TsTx das 1^a, 2^a e 3^a eluições da purificação de DNA, respectivamente. Em C, dois clones positivos da ligação da TsTx no pGEM cortados com Sal I. As setas brancas indicam os fragmentos de DNA obtidos.

2.4 - Subclonagem do DNA da TsTx no vetor pBluescript contendo o DNA da TsTx-I+TsNTxP

Os clones 14(1), pBluescript+TsTx-I₍₂₎+TsNTxP e o clone 16(36), pBluescript+TsTx-I₍₁₎+TsNTxP, foram cortados com a enzima Sal I e tiveram suas pontas desfosforiladas (Figura 53a). O clone 3 da TsTx em pGEM foi cortado com Sal I e o fragmento liberado foi purificado (Figura 53b) e ligado aos vetores já cortados. Os plasmídeos foram obtidos por lise alcalina das colônias positivas.

Um PCR usando os primers do vetor (M13-40 e M13 anti-senso) foi feito após a ligação e um clone da construção com o clone 16(36) e dois clones da construção com o clone 14(1) apresentaram banda maior do que os respectivos clones antes da clonagem (Figura 54). Então os 3 clones positivos foram seqüenciados. O clone 3+36 C7 continha a seqüência de nucleotídeos da TsNTxP, TsTx e TsTx-I inseridas no vetor pBluescript nos sítios certos e em janela de leitura correta. O clone 3+1 G2 e E8 continham a seqüência de nucleotídeos da TsNTxP, TsTx e duas TsTx-I inseridas no vetor pBluescript nos sítios certos e em janela de leitura correta (Figura 55).

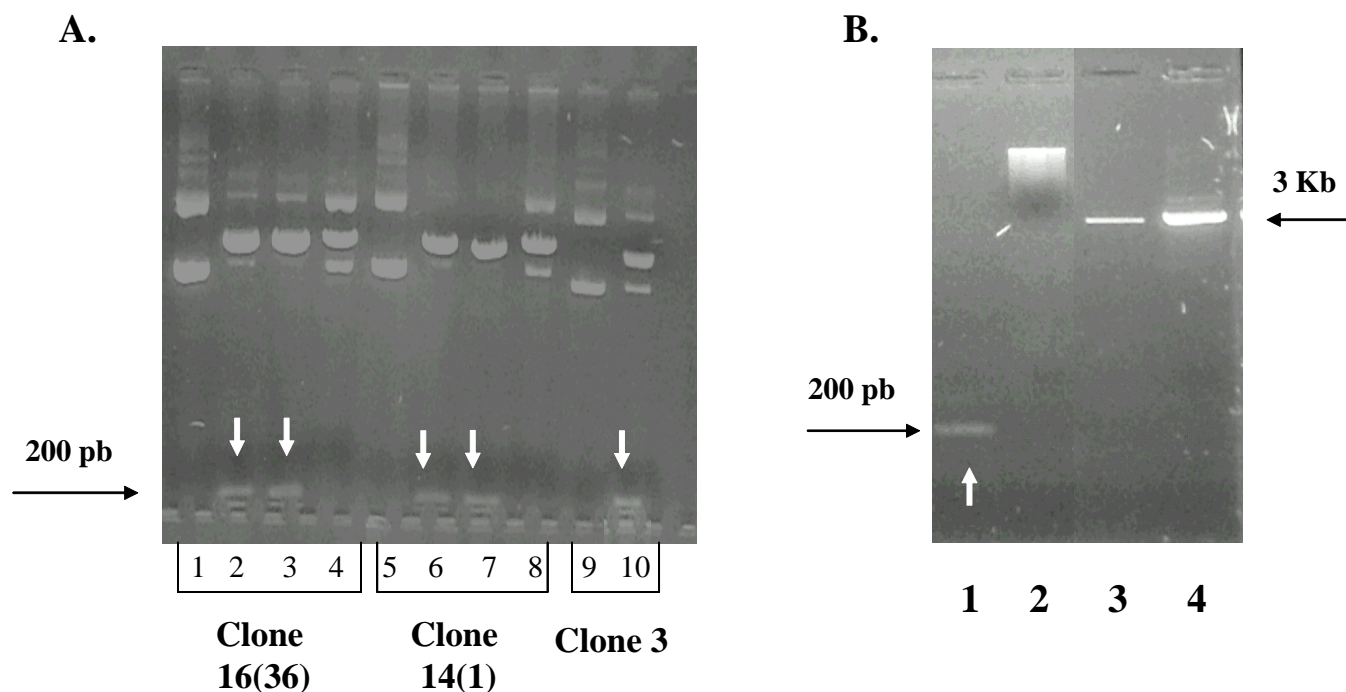


Figura 53 – Clonagem do DNA da TsTx no vetor pBluescript contendo o DNA da TsTx-I +TsNTxP. Em A, o clone 16(36) não cortado, cortado com Hind III, cortado com Xho I e cortado com Sal I, respectivamente; o clone 14(1) não cortado, cortado com Hind III, cortado com Xho I e cortado com Sal I, respectivamente; o clone 3 não cortado e cortado com Sal I, respectivamente. Em B, na canaleta 1 temos o DNA da TsTx liberado do pGEM pelo corte com Sal e purificado; na canaleta 2 temos 100 ng do padrão λ íntegro (Gibco); na canaleta 3 temos o clone 16(36) cortado e desfosforilado e na canaleta 4 temos o clone 14(1) cortado e desfosforilado. As setas brancas indicam os fragmentos de DNA obtidos.

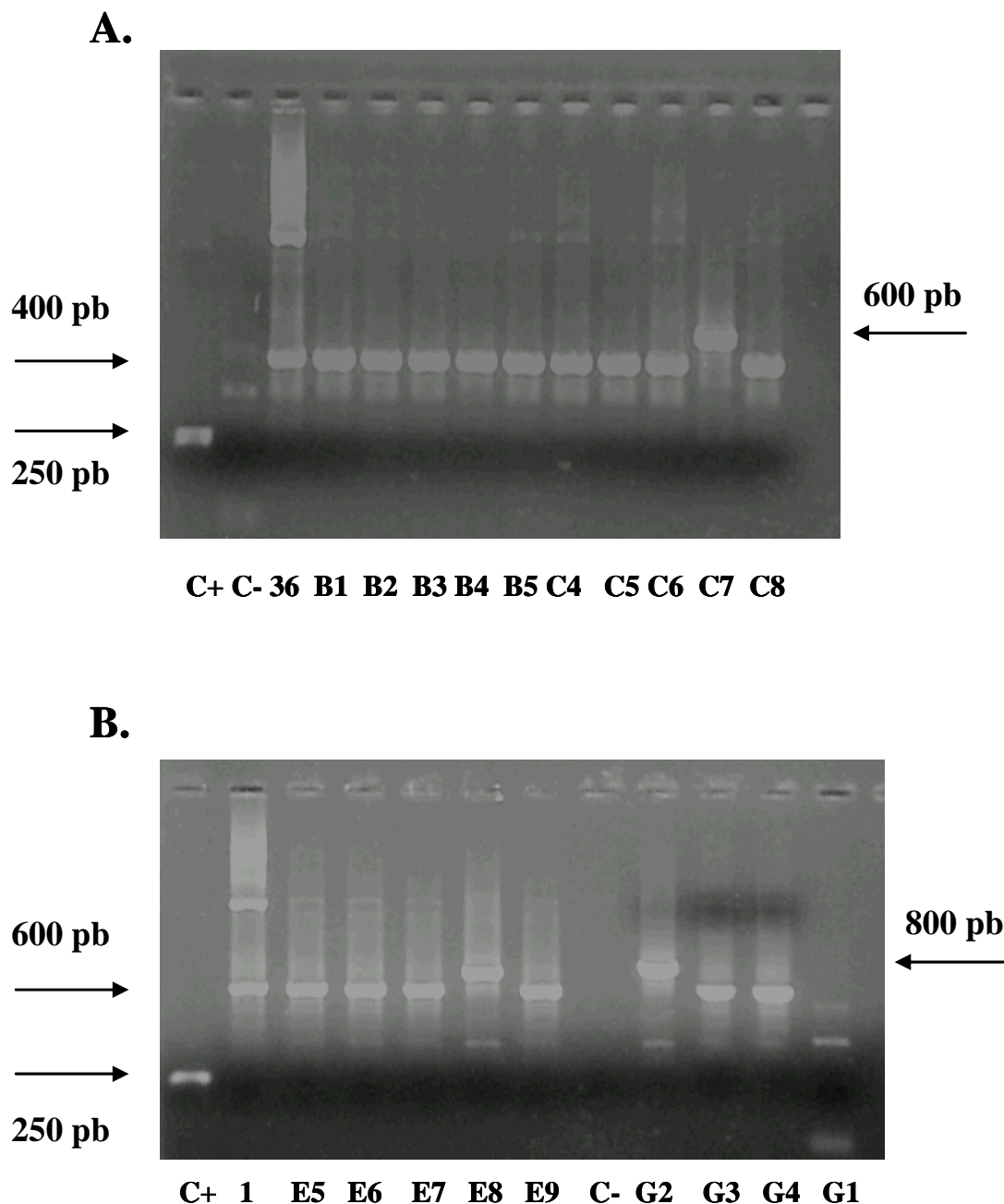


Figura 54 – Verificação da clonagem do DNA da TsTx no pBluescript contendo o DNA da TsTx-l+TsNTxP. Em A, estão mostrados o controle positivo (C+), o controle negativo (C-), o produto de amplificação do clone 16(36) e os produtos de amplificação dos clones obtidos na ligação. Em B, estão mostrados o controle positivo (C+), o controle negativo (C-), o produto de amplificação do clone 14(1) e os produtos de amplificação dos clones obtidos na ligação. Em ambos os casos, o controle positivo é o produto da amplificação do pBluescript com os primers M13 reverso e forward e o controle negativo é a reação de PCR feita sem DNA.

A.

```
>A11 well1 A11 EKThais2701_23032007 Run01 Cimarron 3.12 778
AANTCCAGCATACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACGGGCCCCC
CCTCGAGGGTAGAGAAGGTTATCCAGCGGATTCCAAGGGTTGCAAAATTA
CTTGTTTTCTTACAGCTGCAGGATACTGCAATACAGAATGCACACTCAAA
AAGGGATCATCGGGTTATTGCGCCTGGCCGGCGTGTTACTGCTACGGGCT
TCCAGATTCACTGAAAATTTGGACTAGTGAAACGAATAAATGTGGCCTCG
AGGTCGACAAGAAAGACGGATACCCGGTGGAATACGATAACTGCGCCTAC
ATTTGCTGGAACACGACAACGCTTACTGCGATAAGCTGTGCAAAGACAA
GAAAGCCGATAGCGGATATTGTTACTGGGTTCACATCCTGTGCTACTGCT
ACGGGCTTCCCGATAGCGAACCGACCAAGACCAACGAAAATGCAAATCC
GTCGACGGTATCGATAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGG
TTGCAAACTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAAT
GCGGAATTAAGAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTTAC
TGCTACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAA
ATGTAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTA
GAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTA
TTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGG
```

B.

```
>B11 well1 B11 EKThais2701_23032007 Run01 Cimarron 3.12 866
CAGCGCATACCTCACTAACNGGAACAATAGCTGGGTACGGGCCCCCCTC
GAGGGTAGAGAAGGTTATCCAGCGGATTCCAAGGGTTGCAAAATTACTTG
TTTTCTTACAGCTGCAGGATACTGCAATACAGAATGCACACTCAAAAAGG
GATCATCGGGTTATTGCGCCTGGCCGGCGTGTTACTGCTACGGGCTTCCA
GATTCACTGAAAATTTGGACTAGTGAAACGAATAAATGTGGCCTCGAGGT
CGACAAGAAAGACGGATACCCGGTGGAATACGATAACTGCGCCTACATTT
GCTGGAACACGACAACGCTTACTGCGATAAGCTGTGCAAAGACAAGAAA
GCCGATAGCGGATATTGTTACTGGGTTCACATCCTGTGCTACTGCTACGG
GCTTCCCGATAGCGAACCGACCAAGACCAACGAAAATGCAAATCCGTCG
ACGGTATCGATAAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGC
AACTTAGTTGCTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGG
AATTAAGAAAGGGCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGCCCGCGTGTTACTGCT
ACGGGCTTCCAAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGT
AAGCTTAAAGAAGGTTATCTCAGTGATCACGAAGGTTGCAAACTTAGTTG
CTTTATCAGACCATCGGGATACTGCGGCAGAGAATGCGGAATTAAGAAAGG
GCTCATCGGGCTATTGCGCCTGGGCCCGCGTGTTACTGCTACGGGCTTCC
AAATTGGGTGAAAGTTTGGGATAGAGCGACGAACAAATGTAAAGCTTGA
TATCGAATTTCTGCGCCNGGGGATCCCCCTTGTTCTAGAAGCGGGCGCC
ACCGCCGGTGAGCCTCCATTTGCGCCTTTTGGTTCGNTTACGCGCCACG
GGCGCGTTTTACGTCTGCACTGGGAAACC
```

Figura 55 – Seqüenciamento das construções quiméricas. Em A, o clone 3+36 C7 e em B, o clone 3+1 G2. Os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados: amarelo para Xho I, azul para Sal I e verde para Hind III. As seqüências das toxinas estão em letras coloridas: amarelo para TsNTxP, azul para TsTx e verde para TsTx-I.

III – Expressão e Caracterização das proteínas recombinantes

Duas construções foram escolhidas para a expressão: a construção com 1 (mono: representada por TsTx-I₍₁₎) e 2 cópias (di: representada por TsTx-I₍₂₎) da TsTx-I.

1 – Expressão piloto da TsTx-I₍₂₎

Utilizou-se os clones 43 A4, C7 e C12 que foram transformados em 2 linhagens de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) e Origami. Os tempos de expressão de 0 h (antes da indução), 2, 4, 6 e 24 h (após indução) foram coletados. Na Figura 56 pode-se notar que os três clones expressaram uma proteína de 17 kDa correspondente ao peso da proteína recombinante na bactéria BL21, mas apenas 2 expressaram na Origami. Também pode-se notar que a BL21 expressou mais proteína em um mesmo período de tempo. Para todos os clones, observou-se que há um pequeno aumento da expressão do tempo de 2h para o tempo de 4h, o mesmo ocorrendo no tempo de 6h para 24h. Não há diferença detectável de expressão dos clones entre os tempos de 4h e 6h (Figura 57). O clone 43 A4 e a bactéria BL21 foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos. O tempo de expressão escolhido foi o de 4h.

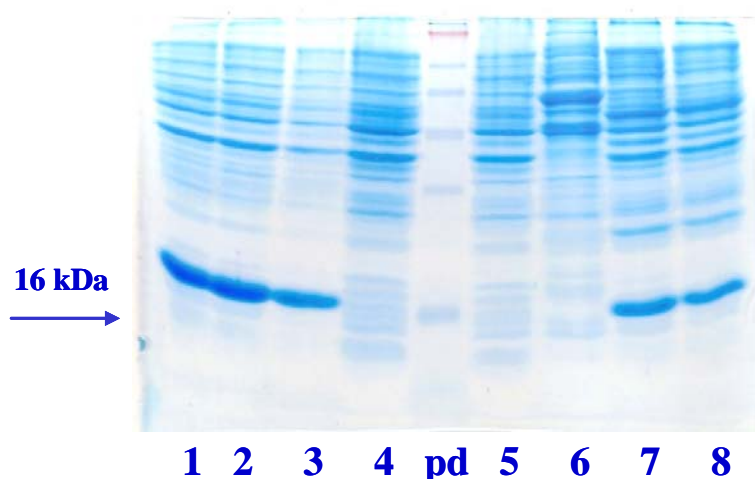


Figura 56 – Expressão piloto da proteína recombinante TsTx-I₍₂₎. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie. Alíquotas de 1 mL eram retiradas da cultura de expressão, centrifugadas e o pellet de bactérias era ressuscitado em 100 µl de tampão de amostra com redução; destes 10 µl eram aplicados no gel. Nas canaletas 1, 2 e 3 estão os extratos bacterianos da expressão de 4 horas dos clones C12, C7 e A4 em BL21 (DE3), respectivamente; na canaleta 4 temos o extrato antes da indução do clone A4 expresso na BL21. Na canaleta 5 temos o extrato antes da indução do clone A4 expresso na Origami; e nas canaletas 6, 7 e 8 estão os extratos bacterianos da expressão de 4 horas dos clones A4, C7 e C12 na Origami, respectivamente. O padrão de peso usado foi SeeBlue® Plus2 pre-stained standard (Invitrogen).

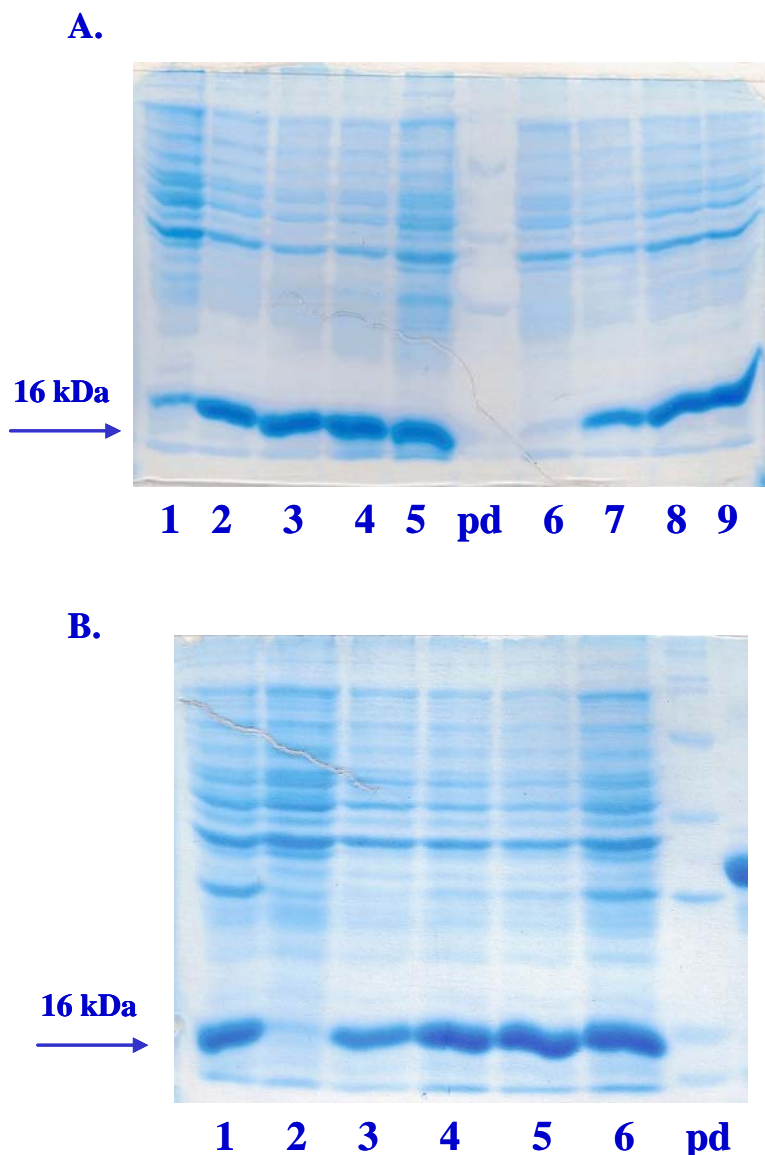


Figura 57 - Curva de expressão dos clones da proteína recombinante TsTx-I₍₂₎ em BL21 (DE3). Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Alíquotas de 1 mL eram retiradas da cultura de expressão, centrifugadas e o pellet de bactérias era ressuspendido em 100 µl de tampão de amostra com redução; destes 10 µl eram aplicados no gel. Em A, temos nas canaletas 1, 2, 3, 4 e 5 os tempos de expressão 0, 2, 4, 6 e 24 horas do clone A4, respectivamente; nas canaletas 6, 7, 8 e 9, os tempos de expressão 0, 2, 4 e 6 horas do clone C7, respectivamente. Em B, temos na canaleta 1 o tempo de 24 horas de expressão do clone C7; nas canaletas 2, 3, 4, 5 e 6 temos os tempos de expressão 0, 2, 4, 6 e 24 horas do clone C12, respectivamente. O padrão utilizado foi SeeBlue® Plus2 pre-stained standard (Invitrogen).

2 – Expressão em larga escala da TsTx-I₍₂₎

Foi feita uma expressão em larga escala com um litro de cultura. Usou-se o clone 43 A4 já transformado anteriormente. Mas não houve expressão como podemos ver na Figura 58.

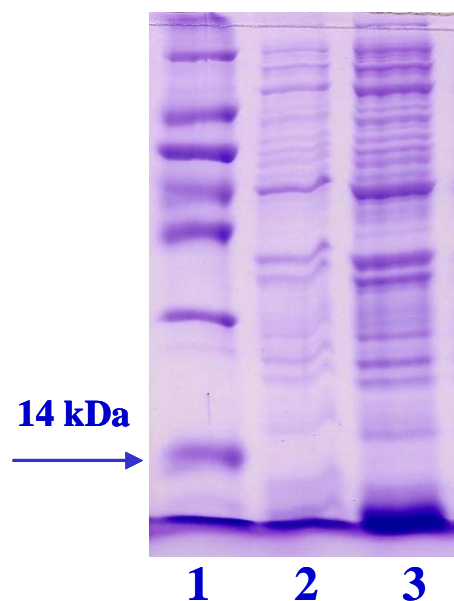


Figura 58 - Expressão em larga escala da proteína recombinante TsTx-I₍₂₎. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Aliquotas de 1 mL eram retiradas da cultura de expressão, centrifugadas e o pellet de bactérias era ressuscitado em 100 µl de tampão de amostra com redução; destes 10 µl eram aplicados no gel. Na canaleta 1 temos o padrão de peso Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience); na canaleta 2 e 3 temos os tempos de 0 e 4 horas da expressão do clone A4.

3 – Teste de expressão TsTx-I₍₂₎

Para se verificar qual era o problema com a expressão, primeiramente o ensaio da expressão em larga escala foi repetido com bactérias recém transformadas. Não se obteve sucesso. Na segunda tentativa, 15 colônias recém transformadas foram coletadas e expressas individualmente cada uma. Como pode-se observar na Figura 59 algumas colônias não estavam expressando. Então, uma colônia mesmo tendo o plasmídeo de expressão recombinante, pode não expressar a proteína recombinante. Sendo assim toda vez que um experimento era iniciado, havia a necessidade de se verificar anteriormente qual colônia estava expressando.

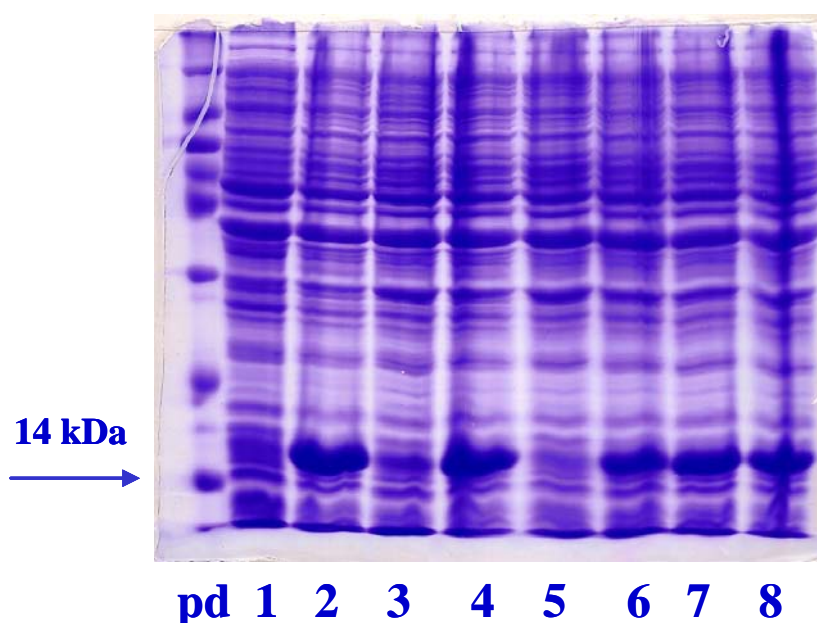


Figura 59 – Triagem das colônias recombinantes da TsTx-I₍₂₎ que estavam expressando. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Alíquotas de 1 mL eram retiradas da cultura de expressão, centrifugadas e o pellet de bactérias era ressuspendido em 100 µl de tampão de amostra com redução; destes 10 µl eram aplicados no gel. Na canaleta 1 temos o tempo de expressão 0 horas do clone A4 e nas demais canaletas temos os tempos de 4 horas de expressão de várias colônias do clone A4. O padrão de peso utilizado foi Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience).

4 – Expressão em Larga Escala e Lise Bacteriana TsTx-I₍₂₎

Duas metodologias foram testadas para verificar qual produzia mais proteína recombinante. A primeira consistiu em expressar 10 colônias individuais em 10 mL de meio e analisar a expressão em gel de poliacrilamida para ver qual estava expressando; e usar o pré-inóculo desta colônia para inocular uma nova alíquota de meio de cultura, que foi o pré-inóculo da expressão em larga escala (1 L ou mais). A outra consistiu em expressar 50 colônias individuais em 10 mL e após análise, as colônias produtoras da proteína recombinante foram lisadas em conjunto (Figura 60).

Depois de 4h de indução, as culturas foram centrifugadas e os pellets ressuspensos em tampão de lise. Após a lise, uma alíquota de cada uma das amostras foi corrida em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Pode-se observar nas Figuras 61 e 62 que a banda de expressão obtida com a primeira metodologia é muito mais fraca do que a banda usando a segunda. Em termos de peso seco de células existe pouca diferença (1^a – 3,7 g/L de células e 2^a – 3,36 g/L de células).

A banda correspondente à proteína recombinante ficou retida no pellet indicando que ela foi expressa de maneira insolúvel em corpúsculos de inclusão. O volume do pellet da TsTx-I₍₂₎ dissolvido em tampão de lise (1^a – 2 mL e 2^a – 1 mL) e a quantidade de proteínas contida neles (Figuras 58 e 59) foram muito similares para as duas metodologias usadas para a expressão.

Verificou-se também o aparecimento de uma banda de 14 kDa tanto no sobrenadante quanto no pellet, que pode ser um fragmento da proteína recombinante ou de uma outra proteína. Essa banda difere da recombinante que está ligeiramente acima.

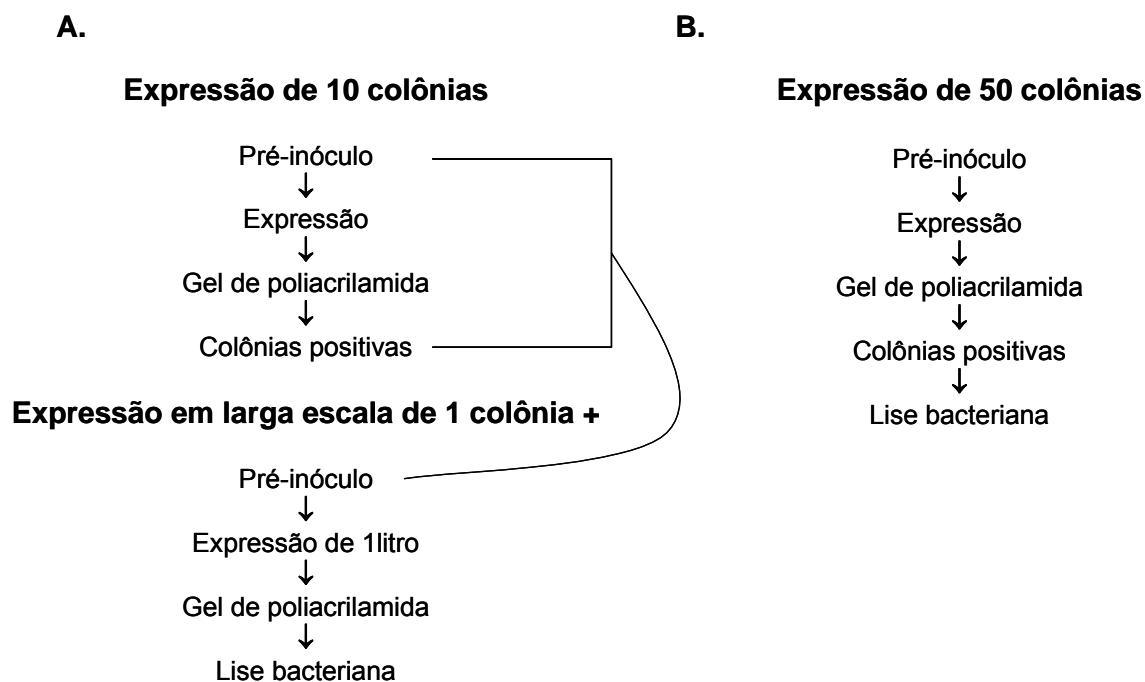


Figura 60 – As duas metodologias utilizadas para expressão em larga escala da TsTx-I₍₂₎. Em A, a primeira metodologia usada, o pré-inóculo de uma das colônias positivas era utilizado para a expressão de 1 litro. Em B, a segunda metodologia, onde todas as colônias positivas eram lisadas em conjunto.

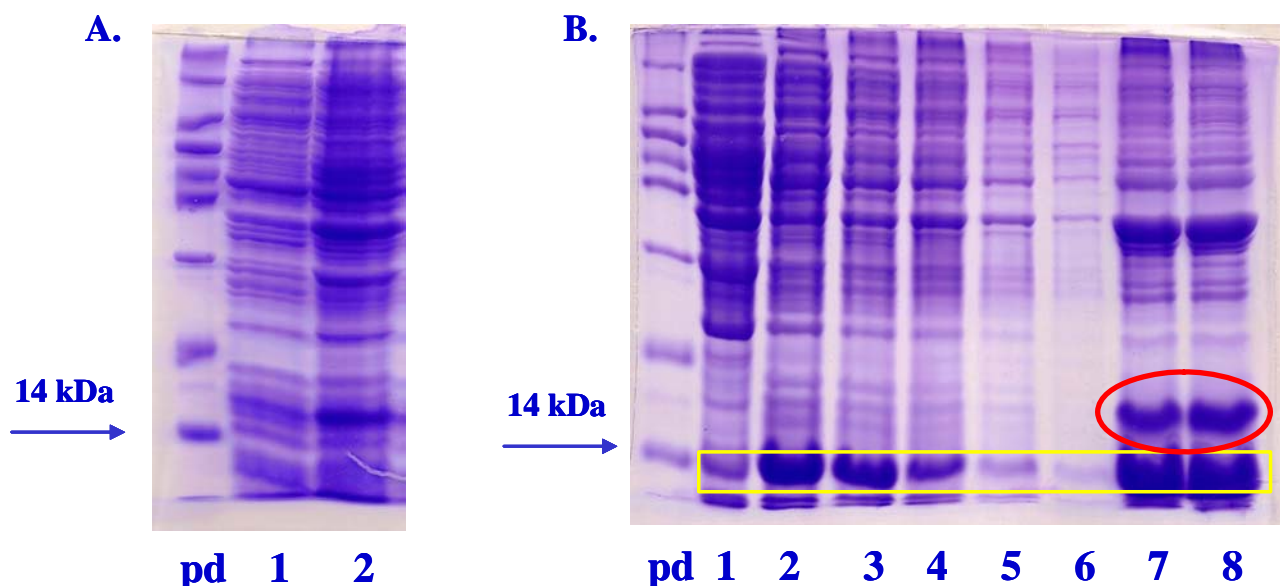


Figura 61 – Lise bacteriana após expressão em larga escala da TsTx-I₍₂₎ utilizando a primeira metodologia. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Em A, temos na canaleta 1 e 2 os tempos de expressão de 0 e 4 horas (10 µl). Em B, temos nas canaletas 1, 2, 3, 4, 5, e 6 os seis sobrenadantes (10 µl) e nas canaletas 7 e 8 os pellets (10 µl), todos obtidos da lise. O padrão utilizado foi Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience). O círculo vermelho indica a proteína recombinante e o retângulo amarelo indica a proteína de 14 kDa.

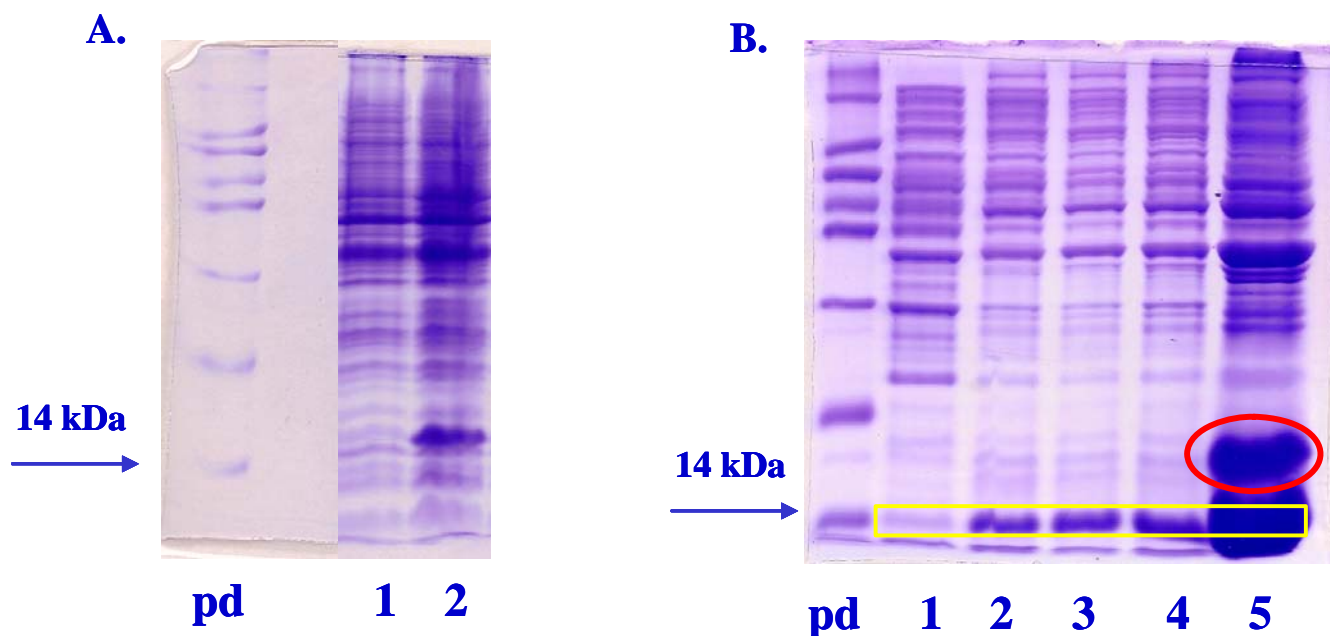


Figura 62 - Lise bacteriana após expressão em larga escala da TsTx-I₍₂₎ utilizando a segunda metodologia. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Em A, temos na canaleta 1 e 2 os tempos de expressão de 0 e 4 horas (10 µl). Em B, temos nas canaletas 1, 2, 3 e 4 os quatro sobrenadantes (10 µl) e na canaleta 5 o pellets (10 µl), todos obtidos da lise bacteriana. O padrão utilizado foi Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience). O círculo vermelho indica a proteína recombinante e o retângulo amarelo indica a proteína de 14 kDa.

5 – Western blotting da TsTx-I₍₂₎

A proteína TsTx-I₍₂₎ recombinante foi caracterizada por ensaio imunológico utilizando a técnica de Western blotting.

Em dois géis de 15% foram aplicadas as seguintes amostras: padrão de massa molecular, extrato bacteriano no tempo 0h e 4h, sobrenadante e pellet da lise (Figura 63). Um gel foi corado com coomassie blue e descorado e o outro foi transferido durante 1h para uma membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada primeiro com anticorpos anti-veneno total de *T. serrulatus* e depois com o respectivo anticorpo secundário (conjugado).

Observou-se que o anticorpo anti-veneno reconhece bem a proteína recombinante, tanto no tempo de 4h de expressão, quanto no pellet da lise. Mas não houve resolução suficiente para determinar se a proteína de 14 kDa (proteína que surge no extrato bacteriano após lise) contida no pellet também está sendo reconhecida. No sobrenadante, existe muito pouco reconhecimento do anticorpo frente à proteína de 14 kDa.

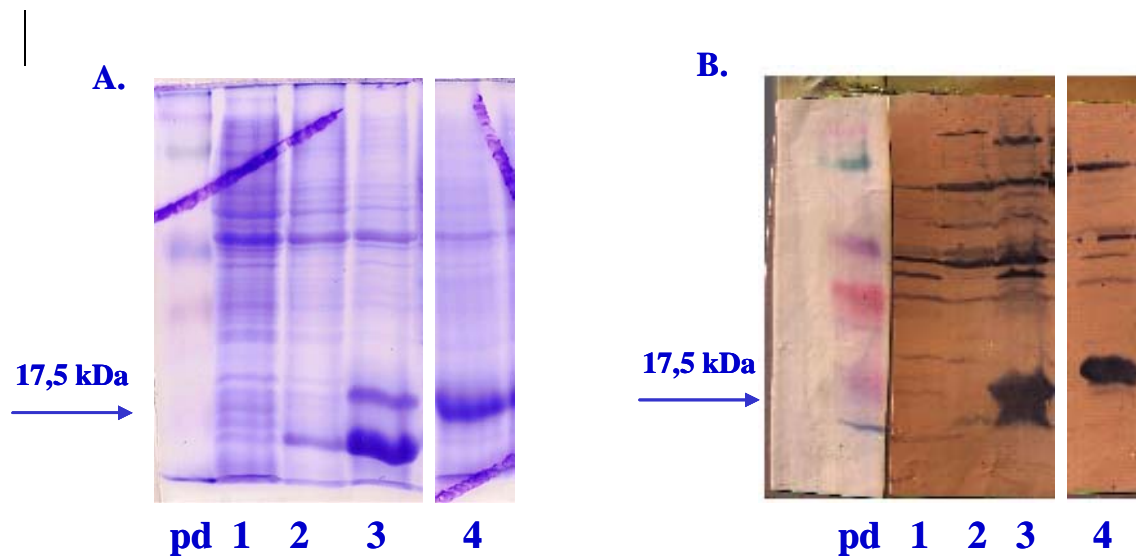


Figura 63 – Western blotting da TsTx-I₍₂₎. Em A, gel de poliacrilamida a 18% corado com azul de coomassie e em B, Westing blotting em membrana de nitrocelulose, foi utilizado soro de coelho anti-veneno de *Tityus serrulatus* na diluição de 1:100. Nas canaletas 1, 2, 3 e 4 temos o tempo de expressão de 0 horas, o sobrenadante e o pellet da lise bacteriana e o tempo de expressão de 4 horas, respectivamente. O padrão utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad). Foram aplicados 10 µl dos extratos de expressão e 20 µg do sobrenadante e do pellet da lise bacteriana.

6 – Tentativa para produzir a proteína recombinante TsTx-I₍₂₎ solúvel

Algumas condições da expressão foram mudadas para verificar se era possível conseguir produzir a proteína recombinante solúvel. As variações foram a utilização de temperaturas mais baixas que 37°C (25 e 30°C) para expressão, diminuição na concentração de IPTG (0,1 mM, 0,05 mM), utilização de um meio mais rico (2% de bactotripton, 1,5% de extrato de levedura, 0,2% de Na₂HPO₄, 0,1% de KH₂PO₄, 0,8% NaCl). Nos três casos, não foi obtido sucesso em produzir a proteína solúvel.

Desta forma, uma expressão com as bactérias BL21 em fermentador foi feita para analisar a interferência do oxigênio dissolvido na solubilização da proteína recombinante. Mesmo com uma quantidade de oxigênio adequada e controlada, as bactérias produziram praticamente toda a proteína de interesse de forma insolúvel. Nos sobrenadantes uma banda muito fraca do tamanho da proteína recombinante foi identificada, mas em quantidade inadequada para ser purificada (Figura 64).

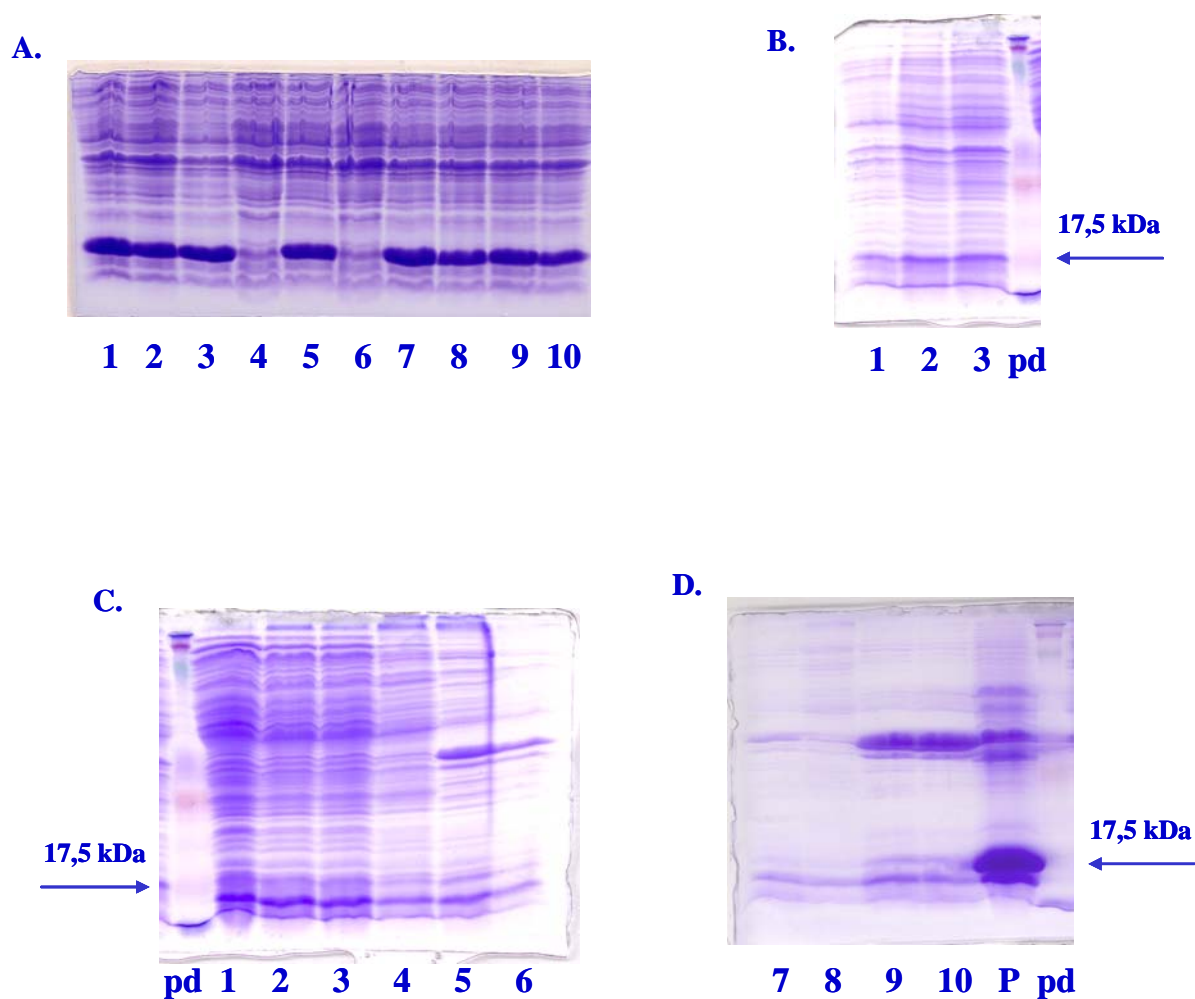


Figura 64 – Expressão da TsTx-I₍₂₎ em fermentador. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Em A, a expressão piloto para verificar as colônias que estavam expressando, os números indicam as colônias. Foram usadas alíquotas de 10 µl do tempo de expressão de 4 horas. Em B, temos nas canaletas 1, 2 e 3, 10 µl dos tempos de 0, 2 e 4 horas de expressão no fermentador do clone A4. Em C e D temos a lise bacteriana, os números de 1 a 10 indicam os dez sobrenadantes obtidos e P indica o pellet obtido. Foram aplicadas no gel alíquotas de 10 µl. O padrão utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad).

7 – Expressão da BL21 e BL21/pET

Para verificarmos a origem da proteína de 14 kDa, a BL21 sem plasmídeo e com plasmídeo (pET sem inserto) foram expressas e o extrato das culturas foram lisados. A banda de 14 kDa não foi expressa nem na BL21 nem na BL21/pET, mas após sonicação ela apareceu em ambos (Figura 65). Visto que a proteína de 14 kDa não estava presente no extrato de bactérias expressos, ela não deve ser uma proteína expressa. Ela apareceu após a lise, sendo assim algum procedimento durante este processo deve ser o responsável por sua origem e como ela estava presente tanto na lise das bactérias sem plasmídeo como na lise das bactérias com o pET sem inserto, possivelmente ela é um fragmento de alguma proteína da bactéria. É necessário saber porque está acontecendo quebra de proteínas durante a lise. Duas possibilidades podem estar envolvidas: quebra por ação de proteases e quebra por ação mecânica do sonicador.

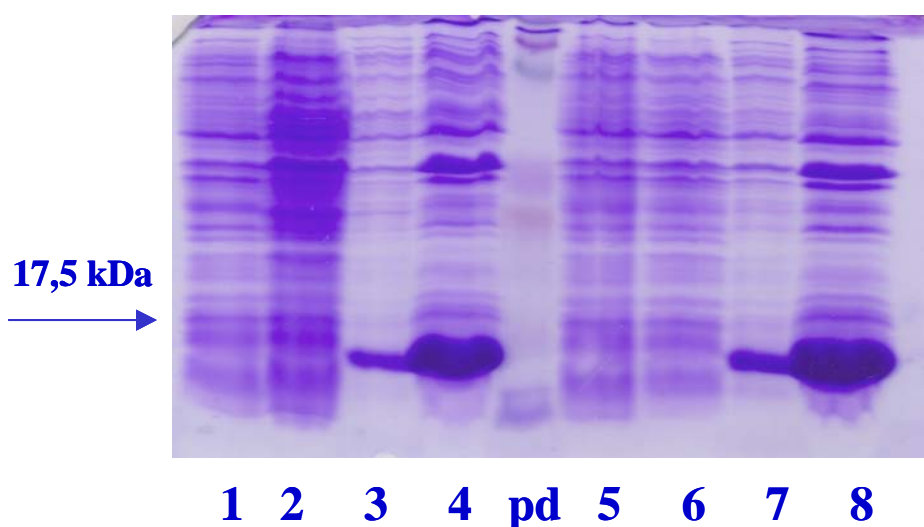


Figura 65 – Expressão de proteínas nas bactérias BL21 e BL21/pET. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Nas canaletas 1, 2, 3 e 4 temos os tempos de expressão de 0 e 4 horas e o sobrenadante e o pellet da lise da expressão da BL21, respectivamente. Nas canaletas 5, 6, 7 e 8 temos os tempos de expressão de 0 e 4 horas e o sobrenadante e o pellet da lise da expressão da BL21/pET, respectivamente. Foram aplicadas no gel alíquotas de 10 µl. O padrão utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad).

8 – Tentativa de reduzir a formação da proteína de 14 kDa

Nestes ensaios foram usados os extratos da expressão do pET sem inserto na BL21 (DE3).

Para verificar se o aparecimento da proteína de 14 kDa é causado por proteases duas técnicas foram testadas. A primeira foi utilizar um inibidor de protease (PMSF) em todas as etapas da lise (Figura 63a). A outra técnica foi a utilização de temperatura (80°C por 1h) para desnaturar qualquer enzima (Figura 63b). Foi verificado também se o tratamento com lisozima tem alguma ação (Figura 66b). Após o tratamento com inibidor de protease e com a temperatura e lisozima, o extrato bacteriano foi sonificado e então a banda de 14 Kda podia ser observada no gel de poliacrilamida.

Sendo assim, parece que o tratamento mecânico foi o responsável pela quebra da proteína. A lise das bactérias com homogeneizador de tecidos e poder, também foi avaliada, mas eles também causavam o aparecimento da proteína de 14 kDa (Figura 66c e d).

A possibilidade de estar acontecendo um processo oxidativo que levasse ao aparecimento de proteína de 14 kDa foi cogitada. Várias concentrações de DTT foram testadas sem sucesso (Figura 66e e f).

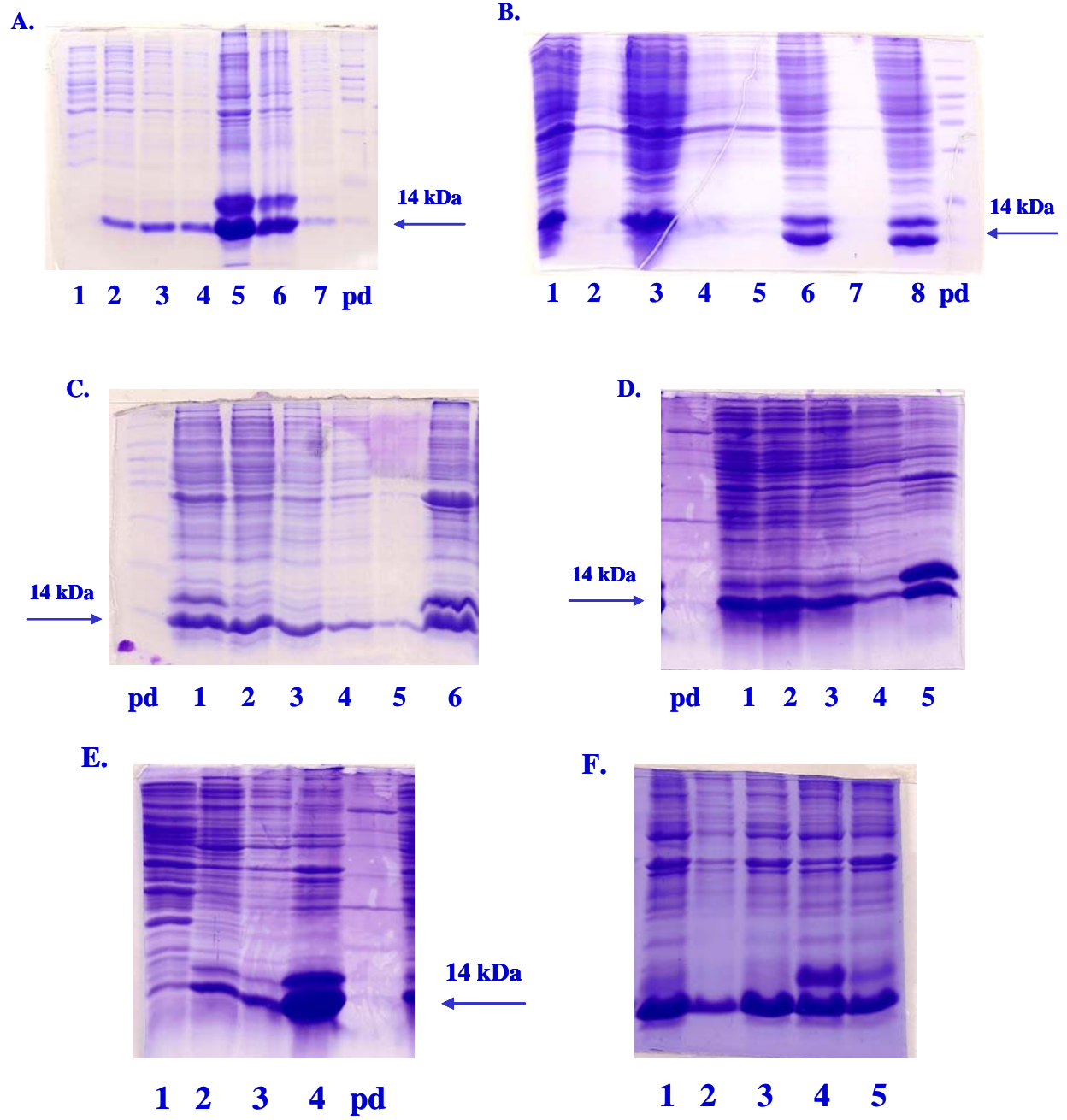


Figura 66 – Processos para tentar evitar o surgimento da proteína de 14 kDa. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Em A, nas canaletas 1 a 4 temos os quatro sobrenadantes da lise feita com PMSF e nas canaletas 5 a 7 temos os pellets obtidos da lise. Em B, nas canaletas 1 e 2 temos o pellet e sobrenadante após 1h a 80°C; na canaleta 3 temos o pellet após tratamento com lisozima e nas canaletas 4 a 6 temos os sobrenadantes e o pellet da lise; nas canaletas 7 e 8 temos sobrenadante e pellet após 16h a 25°C. Em C, lise com homogeneizador de tecidos, nas canaletas 1 a 5 os sobrenadantes e na 6 o pellet da lise. Em D, temos a lise com poter, nas canaletas 1 a 4 temos os sobrenadantes e na 5 o pellet da lise. Em E, temos a lise com 0,5 mM de DTT, nas canaletas 1 a 3 temos os sobrenadantes e na 4 temos o pellet. Em F, temos a lise com várias concentrações de DTT, nas canaletas 1 a 5 temos, pellet sem DTT, com 0,5 mM, com 1 mM, com 2 mM e 4 mM de DTT, respectivamente. Nos géis A a C o padrão utilizado foi o Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience) e nos géis de D a F o padrão utilizado foi Low Range (Promega).

9 – Teste de dissolução da proteína recombinante TsTx-I₍₂₎

Uma alíquota de pellet insolúvel foi tratada com os seguintes reagentes: 6 M de Tiocianato de Guanidina, 6 M de Uréia, SDS 10%, Triton X-100 25%, Tween-20 25%, 4 N NaOH, 3 M de Acetato de Sódio pH 5,2 e 1 M de Tris ácido pH 4,0. Os detergentes Triton X-100 e o Tween 20 falharam em dissolver a proteína insolúvel. Já o SDS dissolveu grande parte dela. O desnaturante Tiocianato de Guanidina não foi muito bom para solubilizar a proteína, uma vez que a maioria das proteínas contaminantes foram dissolvidas, mas a proteína de interesse ficou retida no pellet. A Uréia também dissolveu grande parte das proteínas insolúveis, inclusive a proteína recombinante. As proteínas tratadas com NaOH, não correram bem no gel de poliacrilamida SDS-PAGE, dificultado a análise e a avaliação do seu efeito. O Tris ácido basicamente só dissolveu a proteína de 14 kDa e o acetato dissolveu um pouco a proteína de interesse juntamente com a proteína de 14 kDa (Figura 67).

A concentração mínima de SDS que podíamos usar para dissolver uma quantidade de proteína adequada foi testada. As concentrações de 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% e 10% como controle foram utilizadas. Na Figura 65, pode-se observar que as concentrações de 0,05% e 0,1% não conseguiram diluir a proteína recombinante, mas todas as outras concentrações conseguiram e de forma bastante eficiente. O efeito da temperatura na dissolução do SDS também foi avaliado. O aumento da temperatura solubilizou mais proteínas contaminantes que ficam juntamente com a proteína TsTx-I₍₂₎ no sobrenadante, portanto este procedimento não foi utilizado (Figura 68).

A proteína solubilizada em SDS 0,5% foi dialisada contra tampão fosfato 0,05 M com 0,15 M de NaCl. A diálise durou 3 dias e foram feitas três trocas, ao final havia um precipitado. Um gel de poliacrilamida foi corrido com o sobrenadante e com o precipitado, e verificamos que a TsTx-I₍₂₎ estava no precipitado. Duas possibilidades podem ter acontecido: como a diálise é feita a 4°C, o SDS precipitou levando consigo a proteína de interesse ou a proteína precipitou porque voltou a ficar em uma conformação inadequada e ficou insolúvel. Foi feita uma diálise à temperatura ambiente e outros tampões foram testados, mas o mesmo ocorria.

Então, a dissolução da proteína em uréia 6 M foi feita e uma diálise com

trocas sucessivas; onde a cada troca a concentração de uréia no tampão foi sendo reduzida, até não ter mais uréia no tampão, foi testada. Mas com a redução da concentração de uréia, formou-se um precipitado na membrana de diálise, que foi confirmado ser a proteína TsTx-I₍₂₎.

Todas estas tentativas de dissolver a proteína solúvel e retirar o desnaturante, foram feitas na tentativa de se obter a TsTx-I₍₂₎ solúvel, mas sem substâncias que poderiam interferir na purificação e/ou utilização da proteína. Mas isso não foi possível, sendo assim tentamos outras alternativas para se purificar a proteína.

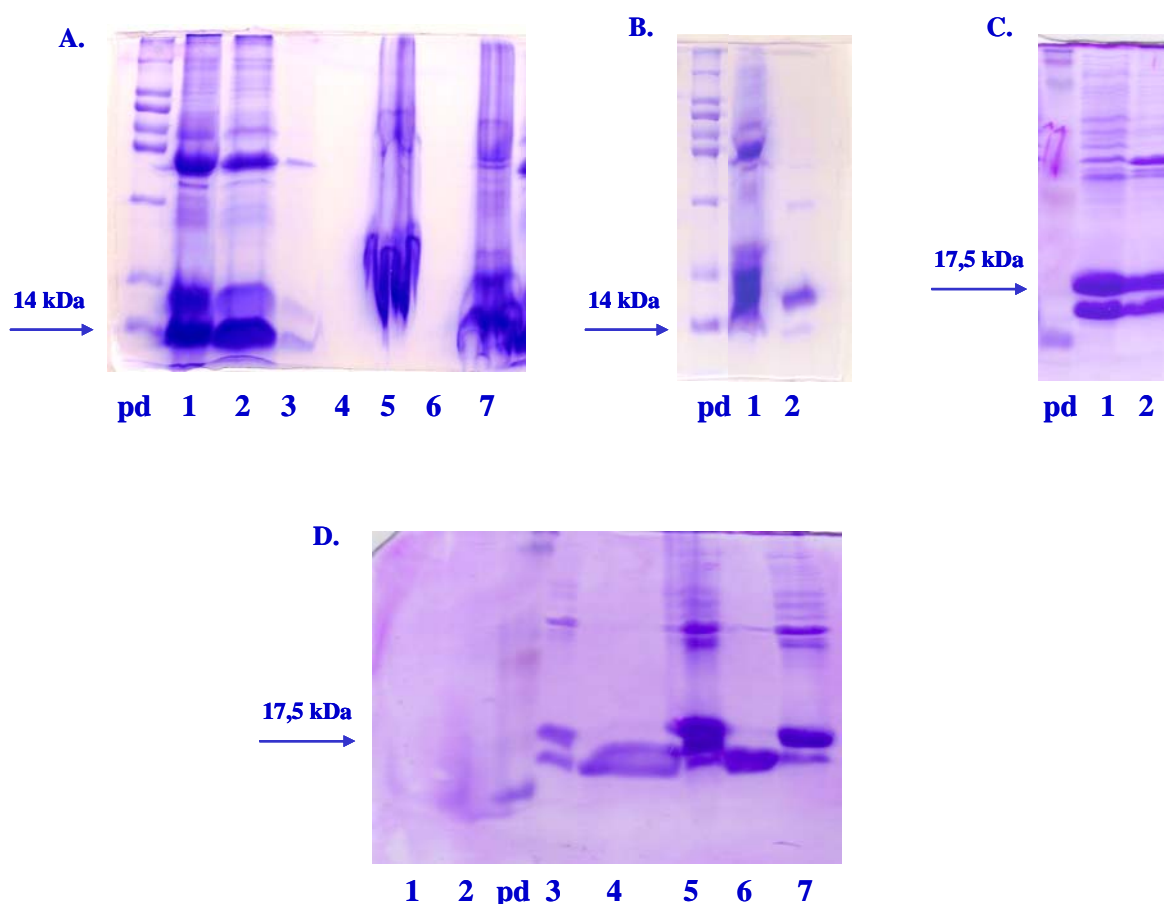


Figura 67 – Solubilização das proteínas insolúveis do pellet da lise da expressão da *TsTx-I₍₂₎*. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie. Em A, nas canaletas 1 e 2 sobrenadante (S) e pellet (P) do tratamento com SDS 10%; nas canaletas 3 e 4, S e P do tratamento com Triton-X 100; nas canaletas 5 e 6, S e P do tratamento com Tween 20, respectivamente. Em B, nas canaletas 1 e 2 temos o sobrenadante e o pellet do tratamento com tiocianato de guanidina. Em C, nas canaletas 1 e 2 temos sobrenadante e pellet do tratamento com uréia. Em D, nas canaletas 1 e 2 temos S e P do tratamento com NaOH; na canaleta 3 temos o pellet da *TsTx-I₍₂₎* sem tratamento; nas canaletas 4 e 5 temos S e P do tratamento com acetato de sódio e nas canaletas 6 e 7 temos S e P do tratamento com Tris ácido. Nos dois primeiros géis, o padrão utilizado foi Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience) e nos dois últimos o padrão Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad).

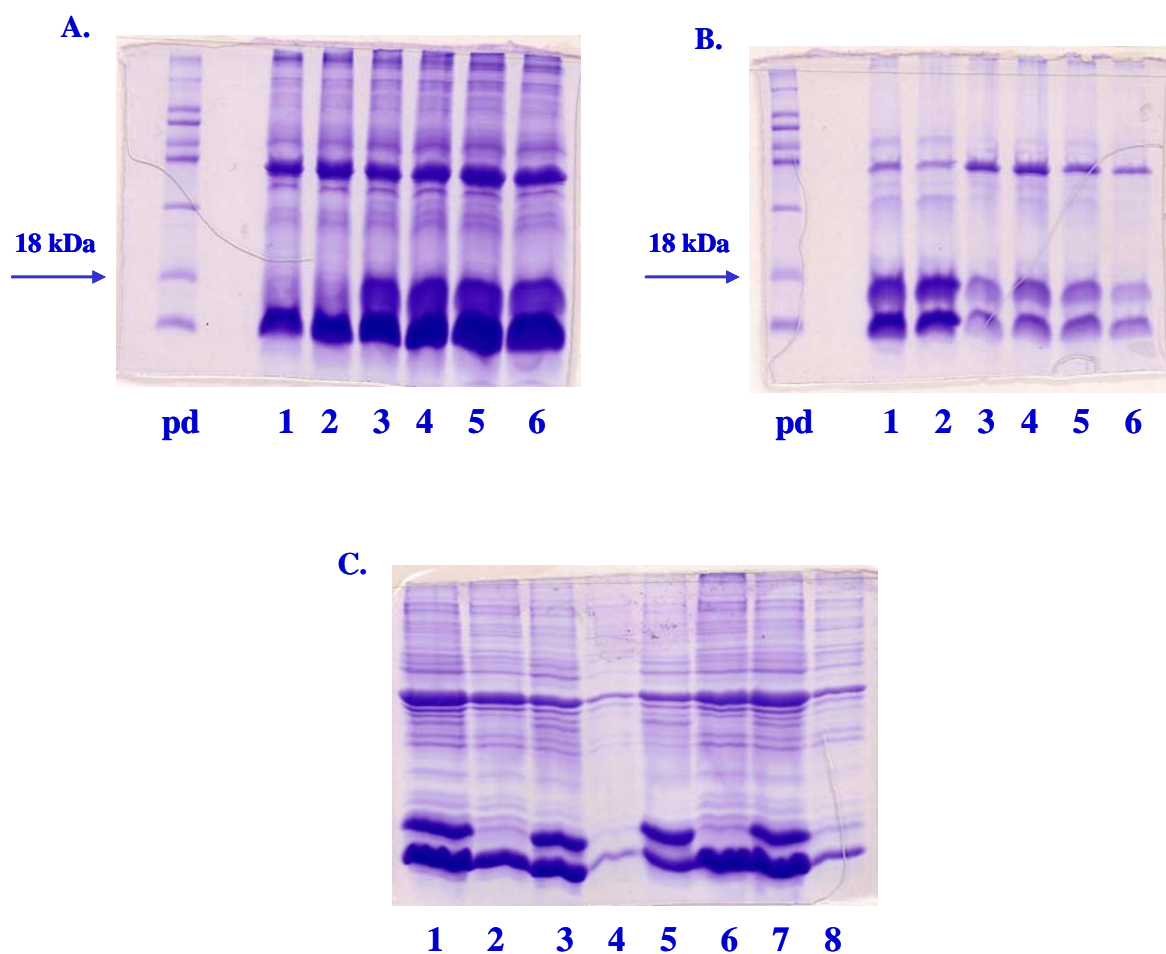


Figura 68 - Solubilização com SDS das proteínas insolúveis do pellet da lise da expressão da TsTx-I₍₂₎. Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de coomassie. Nas canaletas 1 a 6, temos os sobrenadantes (Em A) e os pellets (Em B) do tratamento com 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% e 10% de SDS, respectivamente. O padrão utilizado foi o Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience). Em C, temos nas canaletas 1 a 4 sobrenadante e pellet do tratamento com 0,5% de SDS a 25°C e sobrenadante e pellet com o mesmo tratamento, mas a 65°C, respectivamente; nas canaletas 5 a 8 sobrenadante e pellet do tratamento com 0,25% de SDS a 25°C e sobrenadante e pellet com o mesmo tratamento, mas a 65°C, respectivamente.

10 – ELISA da TsTx-I₍₂₎

A proteína recombinante TsTx-I₍₂₎ foi caracterizada por ELISA com anticorpos anti-veneno total de *Tityus serrulatus*. Na figura abaixo, pode-se notar que o soro imune reage moderadamente com as três fontes de antígenos utilizados. O sobrenadante da lise contém pouca proteína de interesse, por isso sua reação foi mais fraca. De toda forma a diferença de reatividade entre a proteína recombinante e as proteínas da bactéria sem e com inserto foram significantes adotando o nível de significância de 0,01.

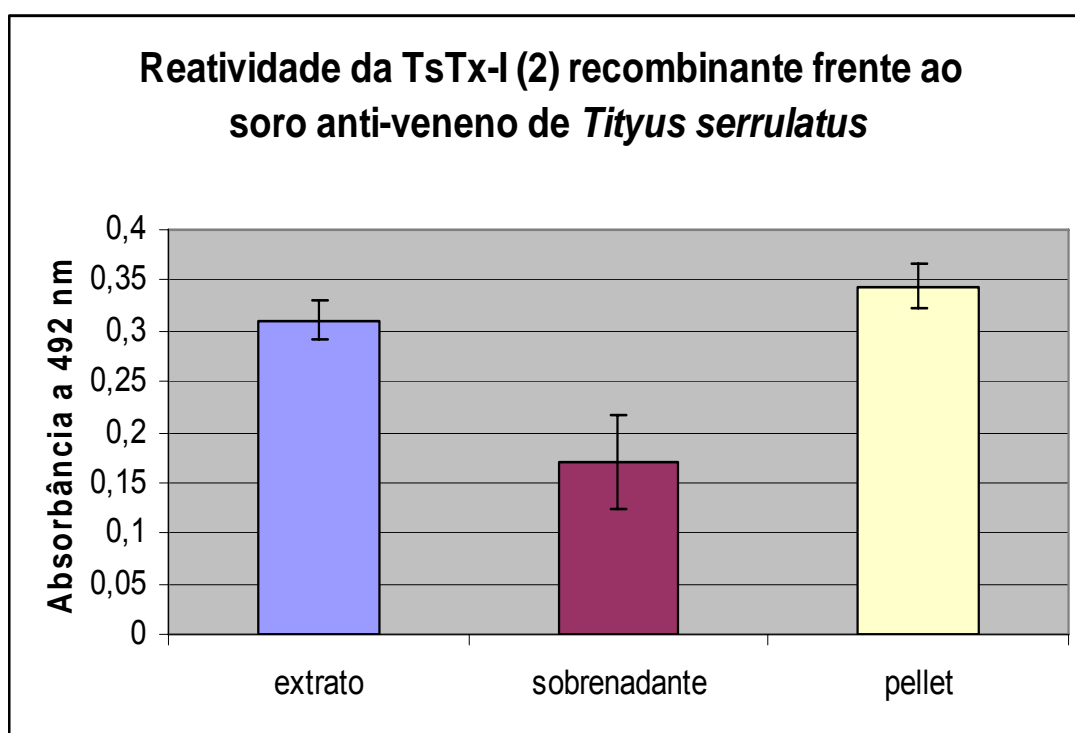


Figura 69 – Reatividade da TsTx-I₍₂₎ frente ao soro anti-veneno de *Tityus serrulatus*. O soro de coelho anti-veneno de *T. serrulatus* foi utilizado na diluição 1:100. Os extratos, sobrenadantes e pellets da expressão da BL 21, da BL21/pET e da TsTx-I₍₂₎ foram usados para sensibilizar a placa de ELISA (5 µg/mL). Os valores da reação inespecífica foi deduzido dos valores apresentados pelos extratos da proteína recombinante.

11 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I₍₂₎

Como a TsTx-I₍₂₎ foi obtida praticamente purificada com tratamento com Tiocianato de Guanidina, foi decidido usar o pellet insolúvel após este tratamento para imunizar os animais.

Sendo assim, a toxicidade da proteína recombinante foi testada, para verificar a quantidade a ser usada para as imunizações. Na tabela abaixo, pode-se ver que quantidades muito maiores da proteína recombinante do que a DL₅₀ da TsTx-I ($\pm 7,5 \mu\text{g}/20\text{g}$) e do veneno de *T. serrulatus*, ($\pm 12 \mu\text{g}/20\text{g}$) não causaram nenhum morte ou sintoma de envenenamento.

Tabela 5 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I₍₂₎

Grupos	Mortes	Sintomas
A – 2 DL ₅₀ do veneno do <i>Tityus serrulatus</i> (24 μg)	4/4	Sudorese, lacrimejação, salivação, prostração.
B – extrato de bactéria da expressão do pET sem inserto (300 μg)	0/4	Sem sintomas. Após alguns dias desenvolveram reação inflamatória no local da inoculação
C – sobrenadante da lise da expressão da TsTx-I ₍₂₎ (300 μg)	0/4	Sem sintomas Após alguns dias desenvolveram reação inflamatória no local da inoculação
D - pellet da lise da expressão da TsTx-I ₍₂₎ (150 μg)	0/4	Sem sintomas Após alguns dias desenvolveram reação inflamatória no local da inoculação
E – pellet da TsTx-I ₍₂₎ tratado com tiocianato de guanidina (150 μg)	0/4	Sem sintomas

12- Expressão piloto da TsTx-I₍₁₎

Devido à instabilidade da expressão observada nos clones contendo o vetor de expressão, foi necessário fazer um piloto para verificar qual colônia expressava a proteína recombinante. Utilizou-se o clone 31 E4 e toda vez que a proteína recombinante foi expressa, ele era transformado um dia antes em bactéria *E. coli* BL21 (DE3). A expressão dessa proteína foi mais difícil, visto que poucas colônias expressavam (Figura 70) e na maioria das vezes que a expressão em larga escala foi feita como na primeira metodologia utilizada para a TsTx-I₍₂₎, a expressão não funcionava. Por isso neste caso a curva de expressão não foi feita e o tempo de 4h que foi utilizado para a proteína recombinante TsTx-I₍₂₎, foi escolhido.

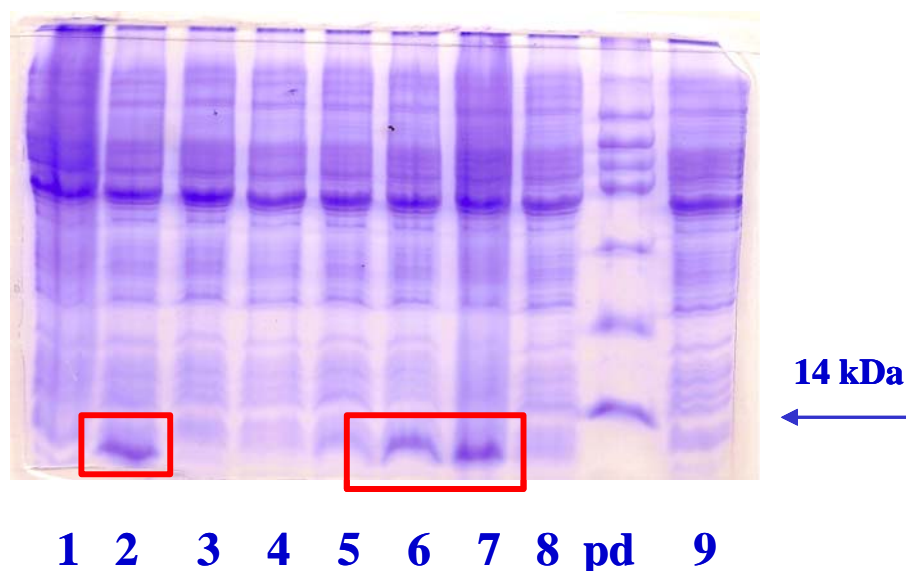


Figura 70 – Triagem de colônias que expressam a proteína recombinante TsTx-I₍₁₎. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie. Alíquotas de 1 mL foram retiradas das culturas de expressão e centrifugadas, os pellets bacterianos eram ressuspensos em 100 µl de tampão de amostra com redução, destes 10 µl eram aplicados no gel. Os números indicam as colônias utilizadas para a expressão piloto. O padrão utilizado foi o Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience). Os quadrados vermelhos indicam a proteína recombinante expressa.

13 – Expressão em larga escala da TsTx-I₍₁₎ e lise bacteriana

Na maioria das vezes foi feita usando 50 colônias que eram expressas em 10 mL de meio de cultura (Figura 71a). Os extratos bacterianos que continham a proteína expressa foram utilizados para fazer a lise bacteriana (Figura 71b). Pode-se observar que também nessa lise houve o surgimento da proteína de 14 kDa. E que a proteína de interesse foi novamente expressa de forma insolúvel, ficando em sua maioria no pellet, mas uma quantidade razoável ficou solúvel nos sobrenadantes.

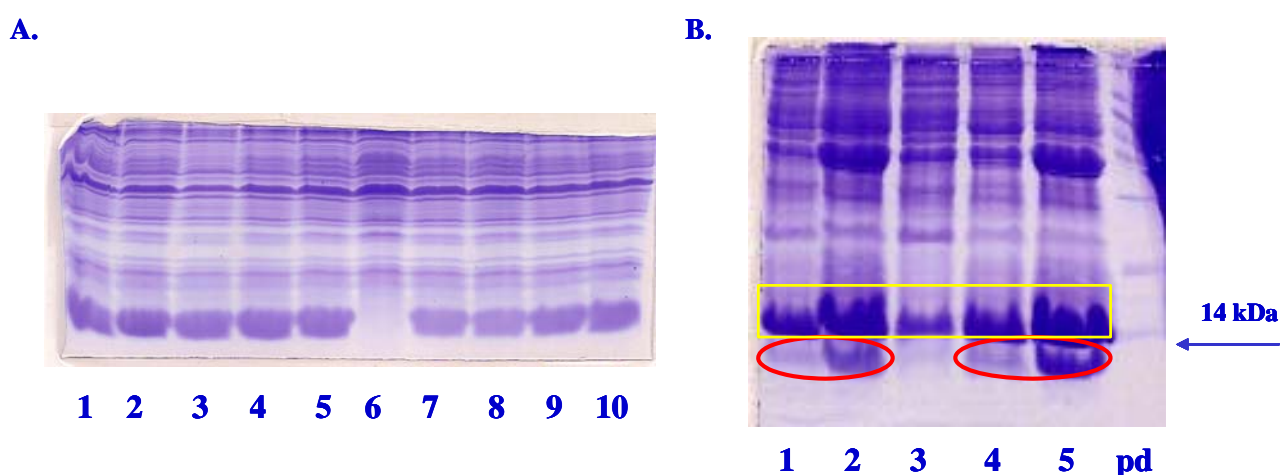


Figura 71 – Expressão em larga escala e lise bacteriana da expressão da TsTx-I₍₁₎. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie. Alíquotas de 1 mL foram retiradas das culturas de expressão e centrifugadas, os pellets bacterianos eram ressuspensos em 100 µL de tampão de amostra com redução, destes 10 µL eram aplicados no gel. Em A, um gel ilustrativo da expressão de 10 colônias das 50; as bactérias após expressão eram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise e uma alíquota de 10 µL era retirada e misturada ao tampão de amostra 2x com redução. Em B, a lise bacteriana, nas canaletas 1 a 4 temos os quatro sobrenadantes obtidos e na canaleta 5 temos o pellet. O padrão utilizado foi o Protein Molecular Weight Marker (Jena Bioscience). Os círculos vermelhos indicam a proteína recombinante e o retângulo amarelo indica a proteína de 14 kDa.

14 – Western blotting da TsTx-I₍₁₎

A proteína TsTx-I₍₁₎ recombinante foi caracterizada inicialmente por ensaio imunológico utilizando a técnica de Western blotting (Figura 69). Os anticorpos anti-veneno total reconheceram a banda de 7 kDa no tempo de 4h de expressão, no sobrenadante e no pellet da lise, mas parece que também reconheceram a banda de 14 kDa. As proteínas do extrato bacteriano da expressão sem indução (tempo de zero hora), praticamente não foram reconhecidas pelo anticorpo. Além disso, no tempo de 4 horas, a banda de 7 kDa (correspondente ao tamanho da TsTx-I) foi reconhecida com alta afinidade e quase não houve reação cruzada com outras proteínas.

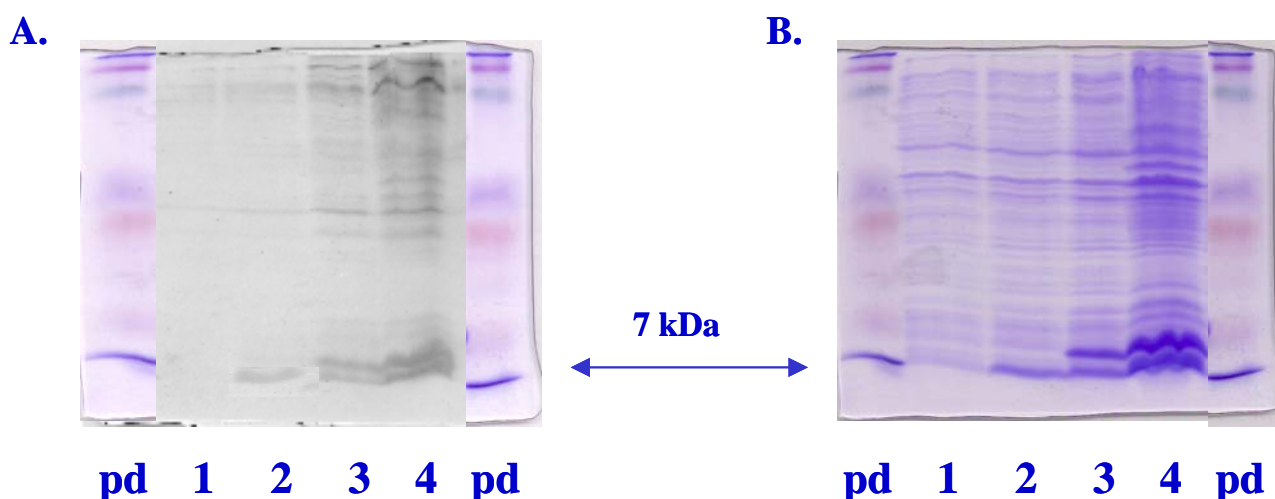


Figura 72 – Western blotting da proteína recombinante TsTx-I₍₁₎. Em A, a membrana de nitrocelulose após Western blotting, onde foi utilizado soro de coelho anti-veneno de *Tityus serrulatus* na diluição 1:100 e em B, o gel de poliacrilamida a 18% corado com azul de coomassie. Nas canaletas de 1 a 4 temos tempo de expressão 0 e 4 horas e sobrenadante e pellet após lise bacteriana, respectivamente. O padrão utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad). Foram aplicados 10 µl dos extratos de expressão e 20 µg do sobrenadante e do pellet da lise bacteriana.

15 – Expressão da TsTx-I₍₁₎ no Fermentador

A TsTx-I₍₁₎ não foi expressa somente como proteína insolúvel, pois após a lise pode-se observar que a banda correspondente à proteína recombinante também estava presente no sobrenadante da lise (Figura 71b). Sendo assim, seria interessante expressar a proteína em grande escala, para conseguir uma quantidade adequada para purificação. Portanto, a TsTx-I₍₁₎ foi expressa em 5 litros de meio de cultura em um fermentador, com várias condições controladas.

Como o problema de expressão de algumas colônias já era conhecido, foi feita uma expressão piloto para verificar qual colônia expressava a recombinante. A colônia 7 foi escolhida por apresentar a maior banda de expressão (Figura 73a). O pré-inóculo desta colônia foi inoculado em 100 mL de meio que foi crescido 16h a 37°C. Essa cultura foi usada como pré-inóculo para os 5 L de meio que foram usados no fermentador. Foram tiradas alíquotas do tempo 0h e dos tempos 2h e 4h. Como pode-se ver na Figura 73b a proteína TsTx-I₍₁₎ foi expressa com sucesso no fermentador. Após as 4h de expressão essa cultura foi centrifugada e submetida à lise bacteriana. A proteína de expressão aparece tanto nos sobrenadantes quanto no pellet da lise, indicando que uma parte dela foi expressa de maneira solúvel (Figura 73c e d).

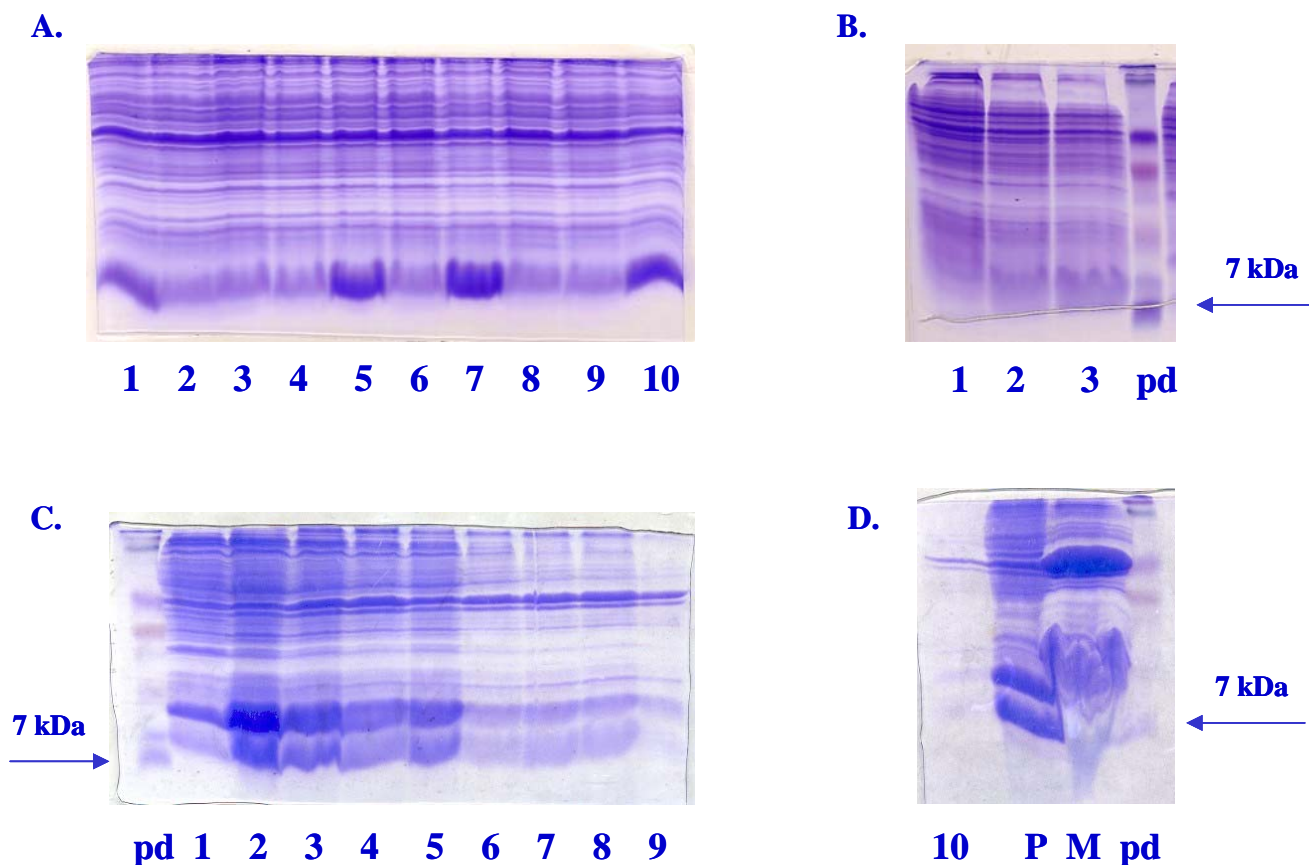
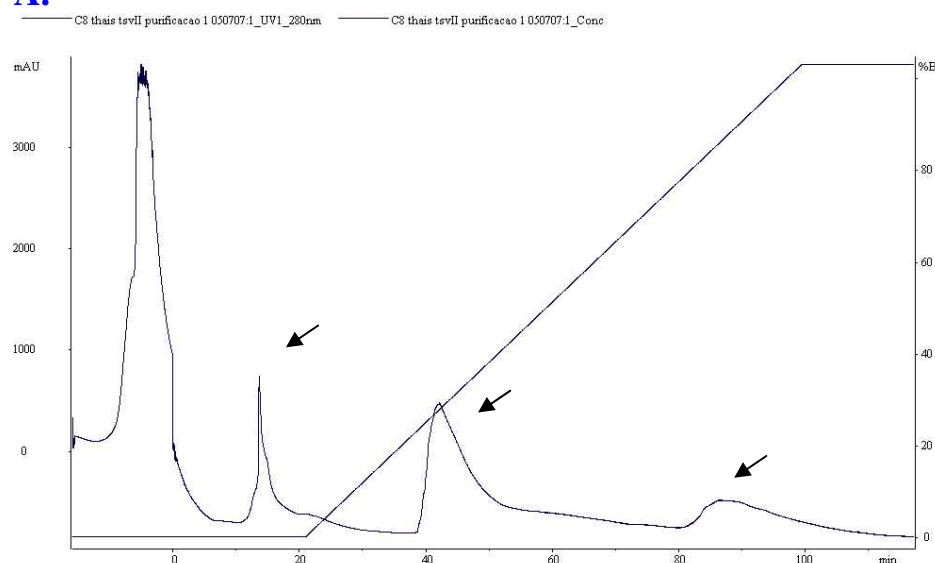
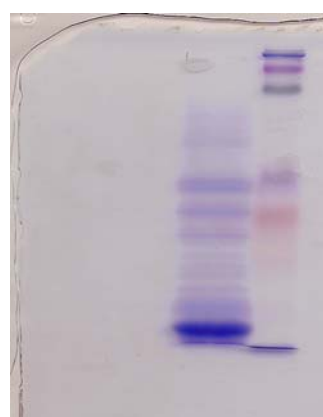


Figura 73 – Expressão da TsTx-I₍₁₎ no fermentador. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie. Em A, a expressão piloto para verificar as colônias que estavam expressando a recombinante. Os números indicam as colônias. Em B, temos nas canaletas 1, 2 e 3 os tempos de 0, 2 e 4 horas de expressão. Em C e D temos a lise bacteriana, os números de 1 a 10 indicam os dez sobrenadantes obtidos. P indica o pellet obtido e M indica uma fração de bactérias não lisadas que precipita junto com o pellet. O padrão utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad). Em todos os géis foram aplicados 10 µl de cada amostra.

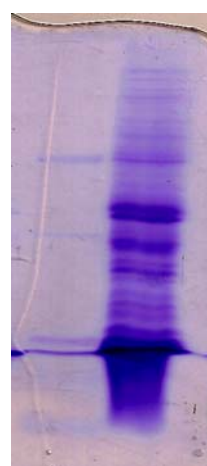
16 – Purificação por cromatografia da TsTx-I₍₁₎

O sobrenadante do fermentador que continha a TsTx-I₍₁₎ foi purificado por cromatografia por HPLC. A coluna semi-preparativa C8 foi utilizada e os tampões usados foram as soluções A (0,1% de ácido trifluoracético em água) e B (0,1% de ácido trifluoracético em acetonitrila). A amostra (10 mL) foi passada na coluna e apenas três picos foram obtidos (Figura 74a). Estes foram agrupados da seguinte maneira: 1 – frações 5 a 7 (0% de acetonitrila); 2 – frações 20 a 33 (35%) e 3 – frações 50 a 77 (75%). Os picos foram liofilizados, ressuspensos em um volume menor e corridos em gel de poliacrilamida. Na Figura 74b e c, pode-se ver que não houve separação suficiente dos componentes da amostra para se obter a TsTx-I₍₁₎ totalmente purificada.

A.**B.**

1 2 3

7 kDa

C.

pd 1

Figura 74 – Tentativa de purificação da TsTx-I₍₁₎ em coluna C8 no HPLC.

Em A, cromatograma da purificação em coluna C8, as setas indicam os picos obtidos. Em B, gel de poliácridamida 15%, nas canaletas 1, 2 e 3 temos os três picos obtidos na purificação. O padrão utilizado é o Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad). Em C, gel de poliácridamida 18%, na canaleta 1, temos o terceiro pico da purificação. O padrão utilizado é o Low Range Marker (Promega).

17 – Teste de dissolução da proteína recombinante TsTx-I₍₁₎

Seguindo os testes realizados com a recombinante TsTx₍₂₎, uma alíquota de pellet insolúvel da TsTx-I₍₁₎ foi tratado com os seguintes reagentes: 6 M de Tiocianato de Guanidina, 6 M de Uréia, SDS 10%, 4 N NaOH, 3 M de Acetato de Sódio pH 5,2 e 1 M de Tris ácido pH 4,0. As proteínas dissolvidas com NaOH correram muito mal no gel de poliacrilamida SDS-PAGE, não sendo possível tirar nenhuma conclusão a respeito. Já o SDS e uréia dissolveram grande parte da proteína de interesse. O desnaturante Tiocianato de Guanidina parece que solubilizou a proteína, mas a visualização da banda de 7 kDa no sobrenadante foi difícil, mas como ela não estava presente no pellet que correu bem, pode-se concluir que ela estava solubilizada no sobrenadante. O Tris ácido só dissolveu a proteína de 14 kDa. Mas o acetato de sódio dissolveu a proteína de interesse e a proteína de 14 kDa (Figura 75).

Como foi obtido um grau de pureza do sobrenadante do tratamento com acetato de sódio da TsTx-I₍₁₎ melhor que a fração purificada pela coluna C8, ele foi utilizado para imunizar os animais. Mas como o acetato pode prejudicar a imunização, primeiro o sobrenadante foi dialisado e liofilizado, para depois ser usado nas imunizações. Durante a diálise grande parte da proteína recombinante precipitou, sendo assim, este material que continha proteínas insolúveis e solúveis foi utilizado para imunização.

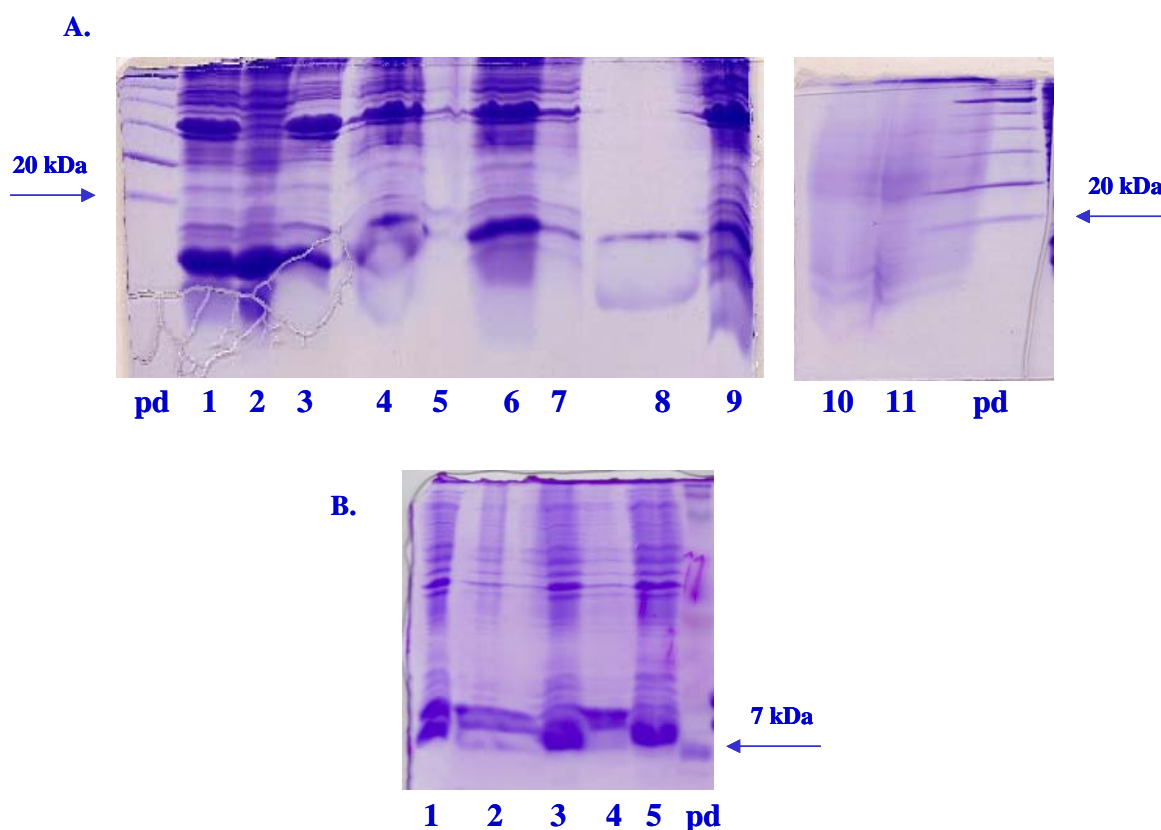


Figura 75 – Solubilização da proteína TsTx-I₍₁₎ recombinante insolúvel. Gel de SDS-PAGE 18% corado com azul de coomassie. Em A, na canaleta 1 temos o pellet da TsTx-I₍₁₎ sem tratamento; em 3 e 2 sobrenadante (S) e pellet (P) do tratamento com uréia 6 M; nas canaletas 4 e 5, S e P do tratamento com tiocianato de guanidina 6 M; nas canaletas 6 e 7, S e P do tratamento com SDS 10%, nas canaletas 8 e 9, S e P do tratamento com acetato de sódio 3 M, nas canaletas 10 e 11 temos S e P do tratamento com NaOH 4 N, respectivamente. Em B, na canaleta 1 temos o pellet da TsTx-I₍₁₎ sem tratamento; nas canaletas 2 e 3 temos S e P do tratamento com acetato de sódio e nas canaletas 4 e 5 temos S e P do tratamento com Tris ácido 1M. Nos dois primeiros géis, o padrão utilizado foi Low Range Marker (Promega) e no último gel o padrão Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad).

18 – ELISA da TsTx-I₍₁₎

A proteína recombinante TsTx-I₍₁₎ também foi caracterizado por ELISA com anticorpos anti-veneno total de *Tityus serrulatus*. Na figura abaixo, pode-se notar que todos os antígenos utilizados reagiram moderadamente com o soro imune. A diferença dos valores de reatividade entre a proteína recombinante e as proteínas da bactéria sem e com inserto foram significantes, adotando o nível de significância de 0,01.

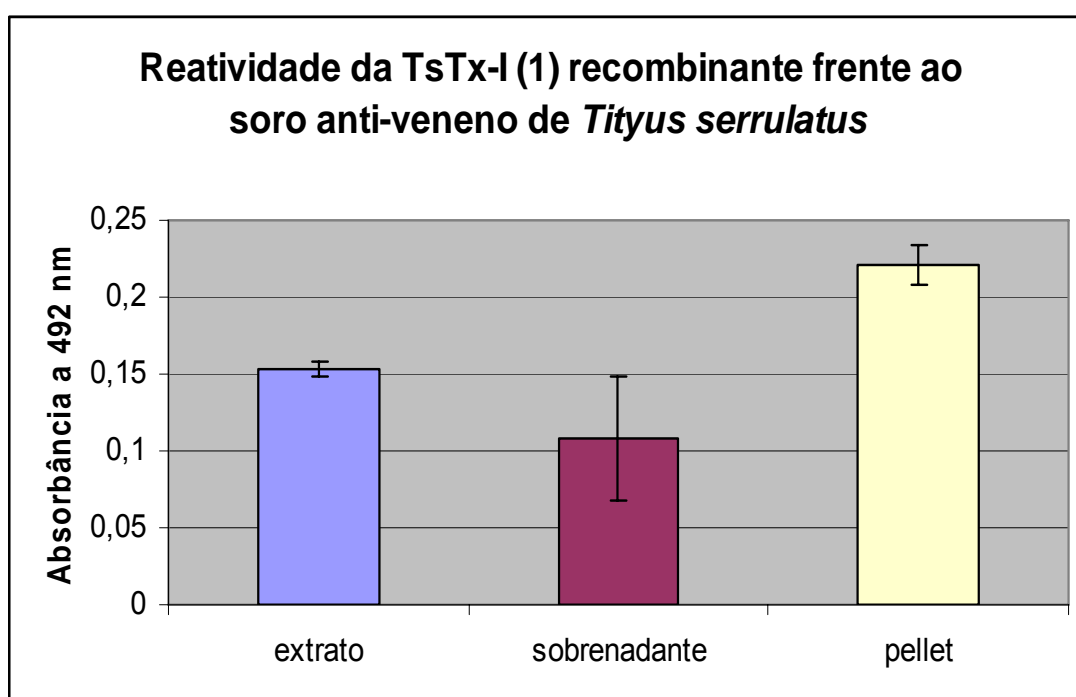


Figura 76 – Reatividade da proteína recombinante TsTx-I₍₁₎ frente ao veneno do *Tityus serrulatus*. O soro de coelho anti-veneno de *T. serrulatus* foi utilizado na diluição de 1:100. Os extratos, sobrenadantes e pellets da expressão da BL 21, da BL 21/pET e da TsTx-I₍₁₎ foram usados para sensibilizar a placa de ELISA (5 µg/mL). Os valores de reações inespecíficas foram deduzidos dos valores absolutos obtidos para os extratos da proteína recombinante.

19 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I₍₁₎

Como o grau de pureza obtido com o tratamento com acetato de sódio foi considerado satisfatório, a decisão de usar o sobrenadante dialisado e liofilizado para imunizar os animais foi tomada.

Sendo assim, a toxicidade da proteína recombinante foi avaliada, para verificar a quantidade que seria usada para as imunizações. Na tabela abaixo, pode-se ver que quantidades muito maiores da proteína recombinante do que a DL₅₀ da TsTx-I ($\pm 7,5 \mu\text{g}/20\text{g}$) ou do veneno de *T. serrulatus* ($\pm 12 \mu\text{g}/20\text{g}$), não causaram morte ou sintoma de envenenamento.

Tabela 6 – Ensaio de Toxicidade da TsTx-I₍₁₎

Grupos	Mortes	sintomas
A – 2 DL ₅₀ do veneno do <i>Tityus serrulatus</i> (30 μg)	4/4	Sudorese, lacrimejação, salivação, prostração.
B – sobrenadante da lise da expressão da TsTx-I- (1) (200 μg)	0/4	Sem sintomas Após alguns dias desenvolveram reação inflamatória no local da inoculação
C - pellet da lise da expressão da TsTx-I ₍₁₎ (150 μg)	0/4	Sem sintomas Após alguns dias desenvolveram reação inflamatória no local da inoculação
D – pellet da TsTx-I ₍₁₎ tratado com acetato de sódio (150 μg)	0/4	Sem sintomas

IV- Produção de soros e teste de potência

1 – Determinação da DL₅₀ do veneno do *Tityus serrulatus*

Tínhamos dois venenos em nosso poder, um liofilizado (a mais de três anos) e um bruto (recém extraído). Sendo assim, a determinação da dose letal suficiente para matar 50% dos indivíduos (DL₅₀) foi determinada para os dois venenos. Foi verificado que a DL₅₀ para o veneno bruto era muito menor que para o veneno liofilizado (Tabelas 7 e 8). Portanto, este fato foi investigado. Uma parte do veneno bruto foi liofilizada, depois ressuspensa e utilizada para se determinar a dose letal 50%. Uma queda pequena na toxicidade do veneno após liofilização foi observada (Tabela 9).

Tabela 7 – Determinação da DL₅₀ do veneno bruto

Quantidade de veneno (µg)	Mortes após 24 horas (n=8)	
	Primeira repetição	Segunda repetição
3,0	0	0
3,6	0	0
4,3	1	1
5,2	3	3
6,25	5	5
DL ₅₀	6,07µg/20g	6,07µg/20g
Media = 6,07µg/20g		

Tabela 8 - Determinação da DL₅₀ do veneno liofilizado

Quantidade de veneno (µg)	Mortes após 24 horas (n=8)	
	Primeira repetição	Segunda repetição
9,0	0	2
10,8	1	3
13,0	1	4
15,6	4	6
18,7	6	8
DL ₅₀	16, 4 µg/20g	11,7 µg/20g
Media = 14,07µg /20g		

Tabela 9 - Determinação da DL₅₀ do veneno bruto que foi liofilizado

Quantidade de veneno (µg)	Mortes após 24 horas (n=8)	
	Primeira repetição	Segunda repetição
4,3	0	0
5,2	1	1
6,25	2	4
7,5	5	5
9,0	7	7
DL ₅₀	7,12 µg/20g	6,8 µg/20g
Media = 6,9 µg/20g		

2 – Titulação dos soros

2.1 – Titulação dos soros dos coelhos

Os animais foram imunizados de acordo com o descrito na metodologia. Um ciclo de imunização (3 doses) não foi suficiente para se obter um bom título de anticorpos, todos os coelhos precisaram de doses reforços. O coelho imunizado com veneno total, só obteve uma boa resposta após o terceiro booster (terceira sangria), esta foi aumentada um pouco com os boosters subsequentes (Figura 77).

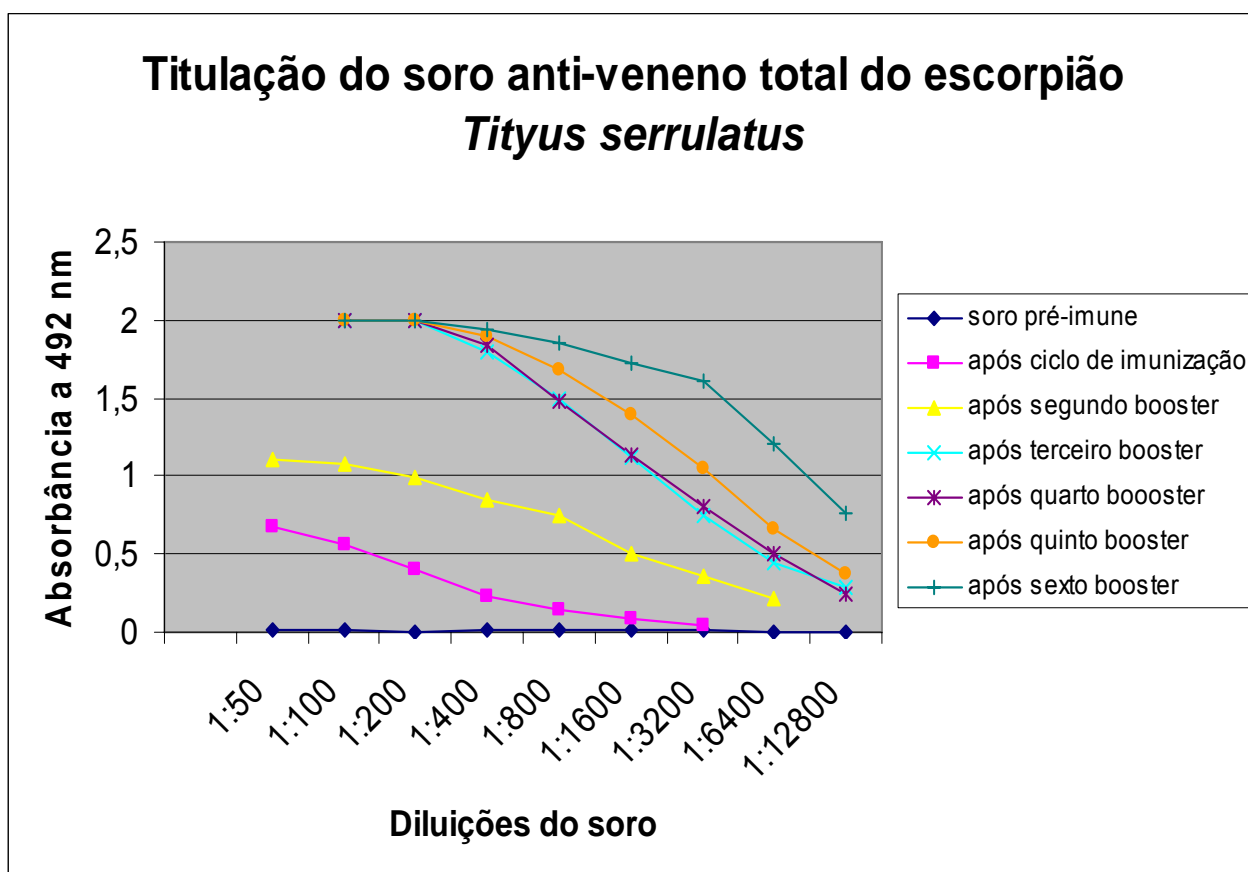
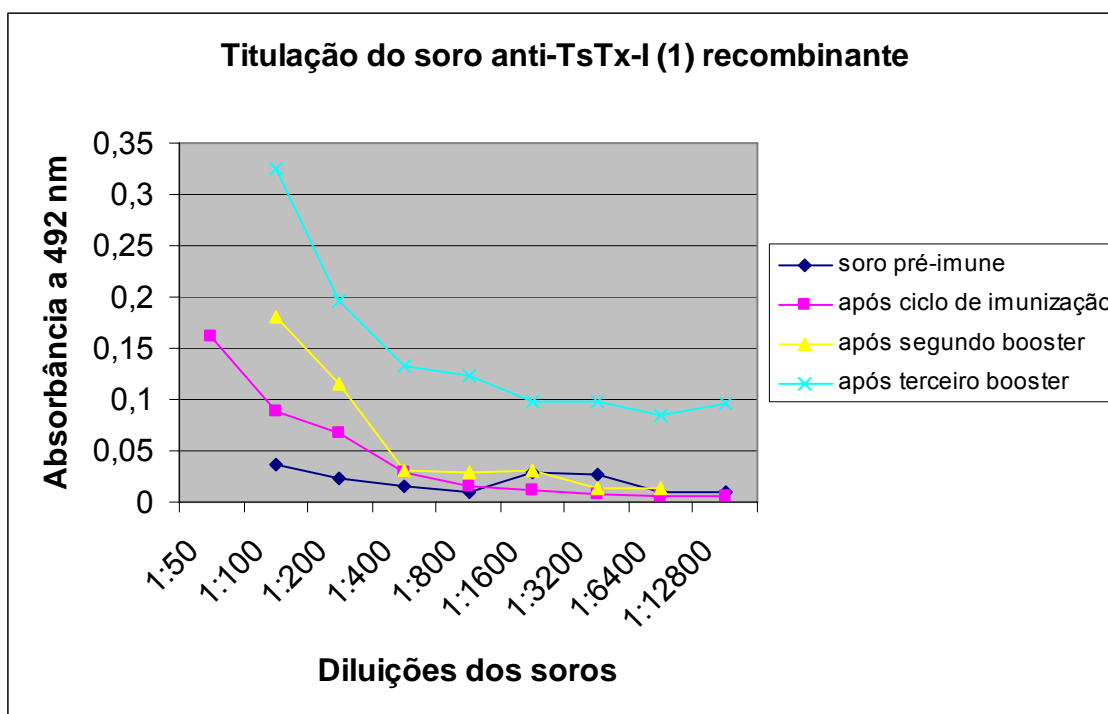


Figura 77 – Titulação do soro anti-veneno total de *Tityus serrulatus*. A placa foi sensibilizada com 5 µg/mL veneno de *Tityus serrulatus*.

Já os animais imunizados com as proteínas recombinantes, mesmo após 3 ou 4 boosters, ainda não tinham uma boa resposta contra o veneno de *T. serrulatus* (Figura 78a e b). O problema parece não ser com os coelhos, pois a reatividade dos soros frente aos imunógenos utilizados (proteínas recombinantes), foi verificada e observou-se que ela estava adequada. De toda maneira, estes soros foram testados quanto a sua capacidade de conferir proteção a camundongos desafiados com o veneno do *Tityus serrulatus*.

A.



B.

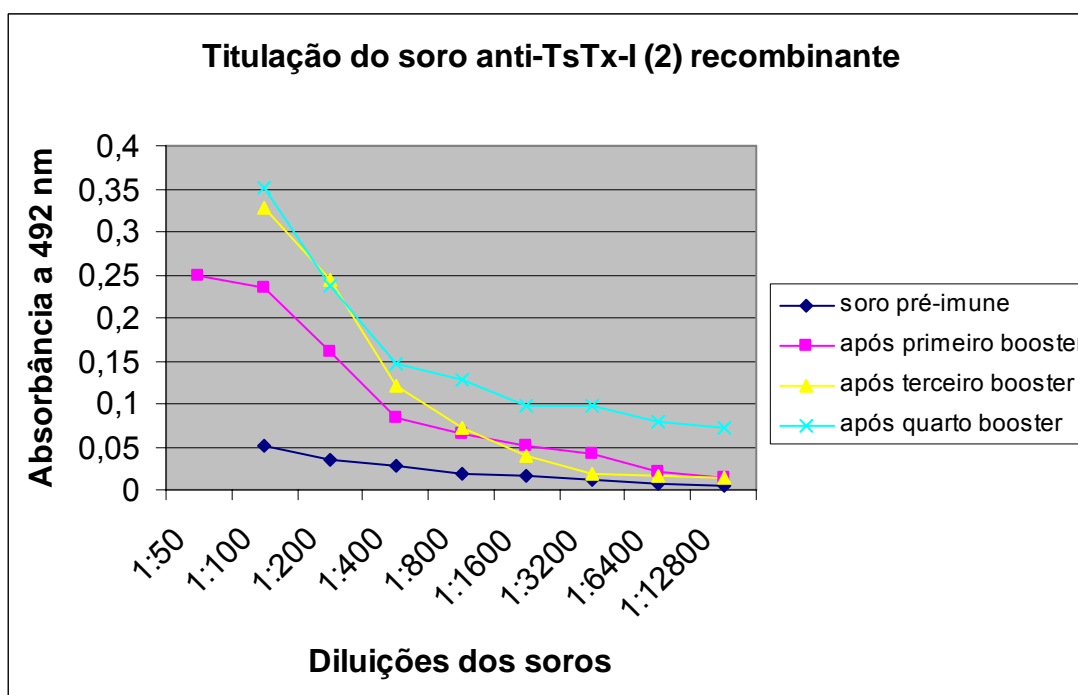


Figura 78 – Titulação dos soros dos animais imunizados com TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎. A placa de ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL veneno de *Tityus serrulatus*.

2.2 – Titulação dos soros dos camundongos

Os camundongos imunizados foram utilizados no ensaio de neutralização *in vivo*. Sendo assim, antes de desafiá-los com o veneno do *T. serrulatus*, o título de anticorpos devia ser verificado para determinar se ele estava adequado. Então os animais foram sangrados por via intraorbital e o soro foi titulado por ELISA. Na Figura 79, pode-se observar que os camundongos imunizados com veneno total e os imunizados com TsNTxP/MBP produziram anticorpos com boa reatividade frente ao veneno de *T. serrulatus*. Os imunizados com as proteínas recombinantes, TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎, produziram anticorpos com uma reatividade suficiente para o ensaio, mas que poderia ser aumentada. Todos os grupos de animais receberam mais uma dose de imunógeno e sete dias depois eles foram desafiados com 2 DL₅₀ de veneno.

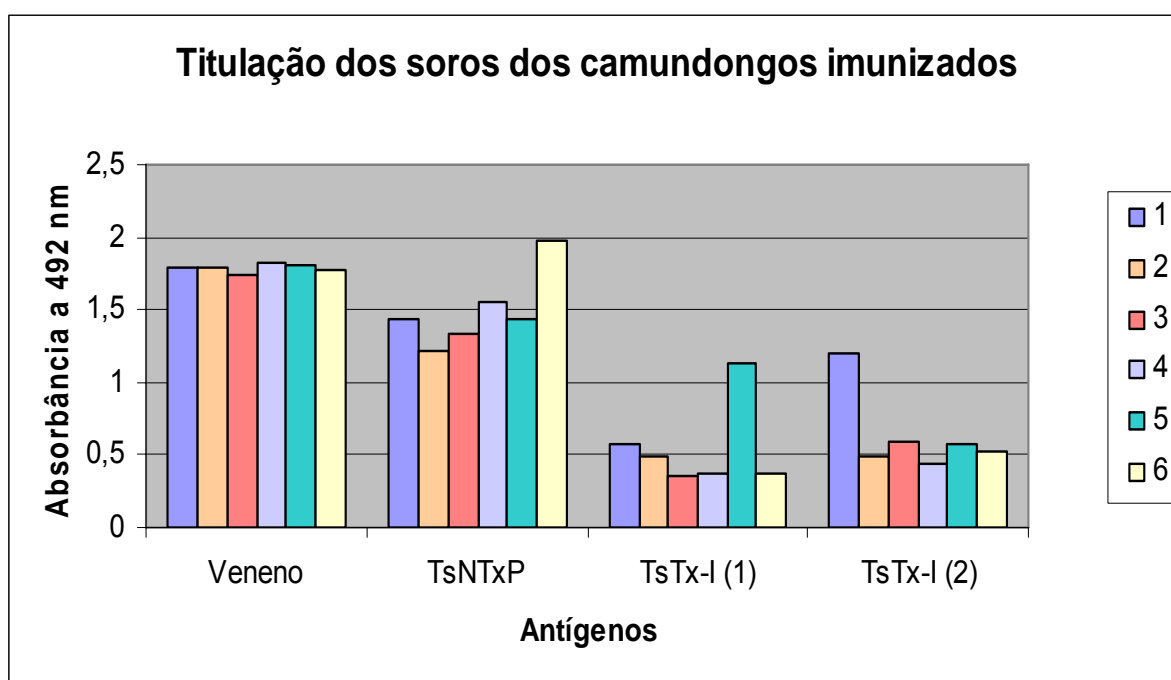


Figura 79 – Titulação dos soros dos camundongos imunizados. A placa de ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL veneno de *Tityus serrulatus*. Na legenda está indicado os números dos animais. A diluição dos soros foi 1:100.

3 – Ensaios de neutralização

3.1 – Neutralização *in vitro*

O soro hiperimune obtido da última sangria de cada coelho foi incubado 1 hora a 37° com 1 ou 2 DL₅₀ do veneno de *Tityus serrulatus*. Após este período camundongos foram injetados com a mistura e a sobrevivência foi verificada após 24 horas. Os resultados estão na tabela abaixo.

Tabela 10 – Neutralização *in vitro*

Grupos	Descrição	DL ₅₀	Sobrevivência	Porcentagem
A	Veneno + PBS	1	2/4	50%
		2	0/4	0%
B	Veneno + soro pré-imune	1	2/4	50%
		2	0/4	0%
C	Veneno + soro anti-veneno	1	4/4	100%
		2	4/4	100%
D	Veneno + soro anti-TsTx-I (1)	1	4/4	100%
		2	2/4	50%
E	Veneno + soro anti-TsTx-I (2)	1	4/4	100%
		2	3/4	75%

Os ensaios foram feitos com 100 e 200 µl de soro anti-recombinante sem alterar a quantidade de veneno (ou seja 1 ou 2 DL₅₀), mas não foram observadas alterações nos resultados. Os animais dos grupos 1 e 2 com 1 ou 2 DL₅₀, apresentaram todos os sintomas de envenenamento (sudorese, lacrimejação, salivação, prostração, dificuldade de coordenação e respiração) e morreram dentro de 0,5 a 1 hora após a inoculação.

Os animais do grupo 3 não apresentaram praticamente nenhum sintoma. Já os camundongos dos grupos 4 e 5, mostraram muitos efeitos do envenenamento, mas em menor grau, e os animais que morreram sobreviveram por um período maior do que os camundongos dos grupos 1 e 2, pelo menos umas oito horas.

Utilizando-se 1 DL₅₀, inicialmente foi observada uma sobrevivência de 100% no grupo 2 (com soro pré-imune). Mas este ensaio foi repetido muitas vezes, mostrando que na maioria das vezes a sobrevivência ficava em torno de 50%, como é o esperado. É possível que a variação individual esteja influenciando o ensaio, sendo assim, é mais prudente utilizar um número maior de camundongos quando 1 DL₅₀ for usada.

3.2 – Capacidade de proteção após vacinação

Visto os problemas de se utilizar uma dose letal 50%, decidimos usar duas (12,14 µg) para o experimento de neutralização *in vivo*. Como os animais ficaram mantidos por um tempo grande até a obtenção de um título adequado, eles aumentaram de peso. Sendo assim, os animais foram pesados para o cálculo da quantidade de veneno que seria necessário utilizar (Tabela 11). Como foi explicado na metodologia consideramos apenas 60% do aumento do peso para calcular o acréscimo de veneno a ser utilizado.

Apenas os camundongos imunizados com PBS+adjuvante morreram com 24 horas do desafio (Tabela 12). Mas após 30 horas morreram dois animais do grupo 3 (1 e 2), os mais obesos de todos os grupos, o que pode indicar correta a nossa decisão de não considerar o valor total do acréscimo do peso dos camundongos. Todos os outros animais sobreviveram.

Tabela 11 – Cálculo de quantidade de veneno a ser usada proporcional ao peso

Grupo	Peso (g)	Acréscimo de peso (g)	60% do acréscimo (g)	Peso total (g)	Quantidade veneno (µg)	Quantidade veneno (µl)
G1- 1	36,5	16,5	10	30	18	4,7
G1- 2	46,6	36,5	16	36	22	5,7
G1- 3	38,6	18,5	11	31	19	4,9
G1- 4	42,7	23	14	34	20,5	5,3
G1- 5	41,2	21	12,5	32,5	20	5,2
G1- 6	42,0	22	13	33	20	5,2
G2- 1	44,0	24	14,5	34,5	21	5,4
G2- 2	34,0	14	8,5	28,5	17	4,4
G2- 3	46,0	26	15,5	35,5	21,5	5,6
G2- 4	50,5	30,5	18	38	23	6,0
G2- 5	39,0	19	11	31	19	4,9
G2- 6	43,0	23	14	34	20,5	5,3
G3- 1	54,6	34,5	21	41	25	6,5
G3- 2	63,5	43,5	26	46	28	7,3
G3- 3	45,6	25,5	15	35	21	5,4
G3- 4	39,0	19	11	31	19	4,9
G3- 5	40,0	20	12	32	19,5	5,1
G3- 6	42,6	22,6	13,5	33,5	20	5,2
G4- 1	44,0	24	14,5	34,5	21	5,4
G4- 2	38,0	18	11	31	19	4,9
G4- 3	38,0	18	11	31	19	4,9
G4- 4	38,0	18	11	31	19	4,9
G4- 5	43,6	23,5	14	34	20,5	5,3
G4- 6	45,5	25,5	15	35	21	5,4

Tabela 11 - Cálculo de quantidade de veneno a ser usada proporcional ao peso

Grupo	Peso (g)	Acréscimo de peso (g)	60% do acréscimo (g)	Peso total (g)	Quantidade veneno (µg)	Quantidade veneno (µl)
G5- 1	38,5	18,5	11	31	19	4,9
G5- 2	40,0	20,0	12	32	19,5	5,1
G5- 3	46,0	26,0	15,6	35,5	21,5	5,6
G5- 4	34,0	14,0	8,5	28,5	17	4,4
G5- 5	42,7	23,0	14	34	20,5	5,3
G5- 6	44,0	24	14,5	34,5	21	5,4

Tabela 12 – Capacidade de neutralização após vacinação

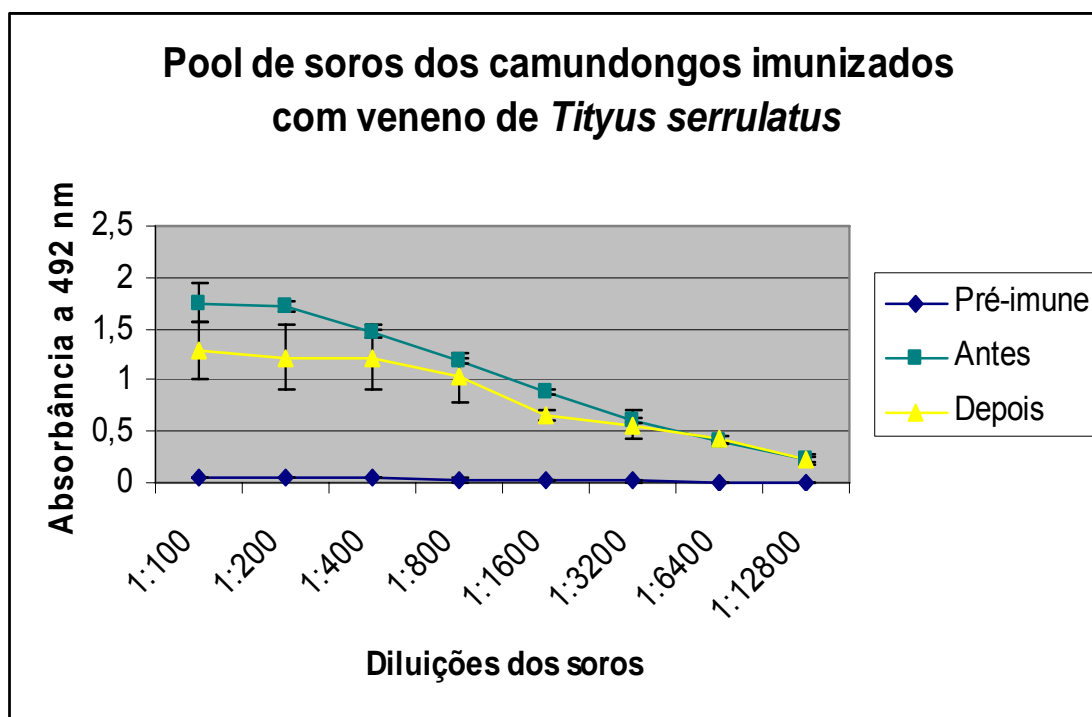
Grupos	Descrição	Sobrevivência 24 horas	Porcentagem
A	Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	6/6	100%
B	TsNTxP/MBP	6/6	100%
C	TsTx-I (1) recombinante	6/6	100%
D	TsTx-I (2) recombinante	6/6	100%
E	PBS	0/6	0%

3.3 – Comparação da titulação dos soros dos camundongos antes e depois do desafio

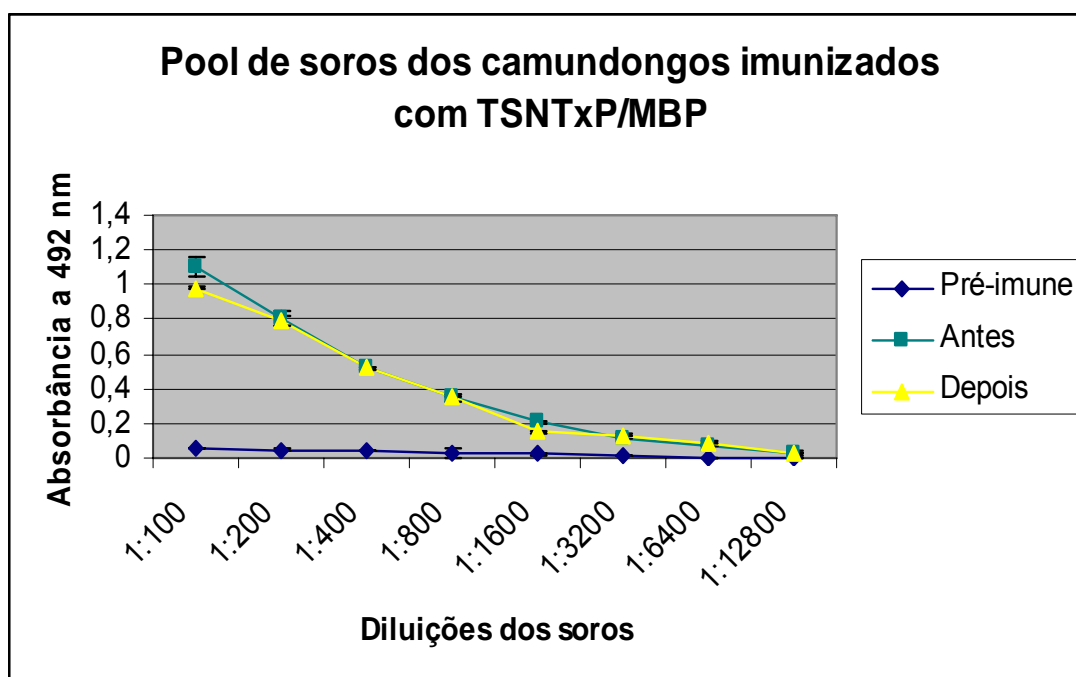
Os animais que sobreviveram ao desafio com o veneno foram sangrados 72 horas depois. Foi feita uma comparação do título de anticorpos no pool de soros dos camundongos antes e depois do desafio. Para isso os dados foram analisados pelo teste de hipóteses, a distribuição amostral foi considerada normal e o nível de significância adotado foi de 0,01.

Para os animais imunizados com veneno total de *Tityus serrulatus* pode-se observar uma pequena queda na quantidade de anticorpos depois do desafio, que é significativa até a diluição de 1:1600 (Figura 80a). Em relação aos animais imunizados com TsNTxP/MBP não houve diferença significativa até a diluição de 1:1600, com exceção da diluição de 1:800 (Figura 80b). Já com os animais imunizados com as toxinas recombinantes TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎ o título de anticorpos depois do desafio foi maior do que o título antes do desafio para todas as diluições (Figura 80c e d).

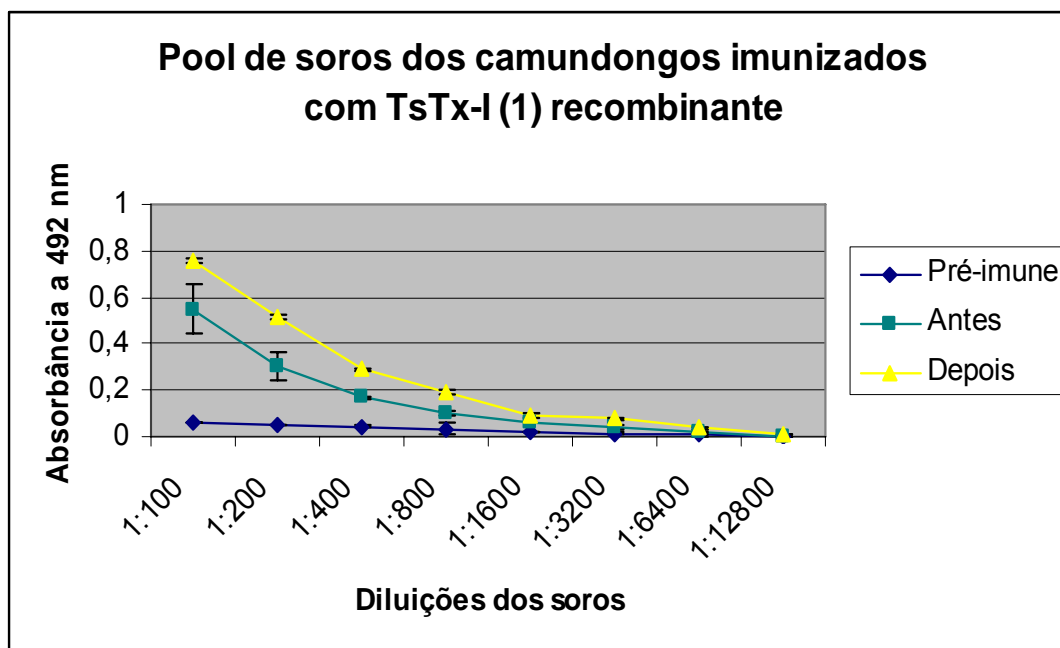
A.



B.



C.



D.

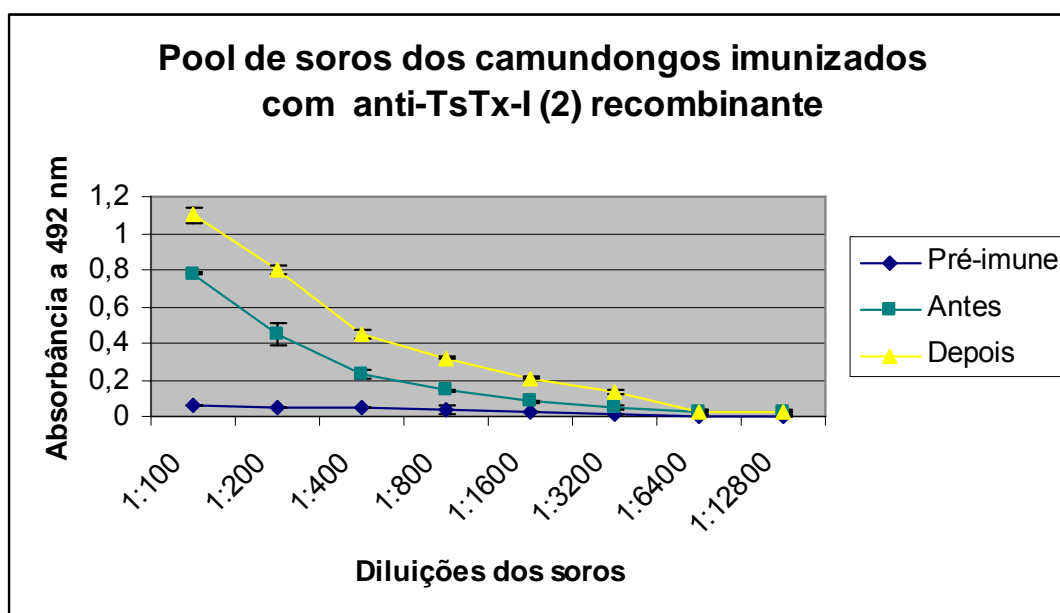


Figura 80 – Titulação do pool dos soros dos camundongos imunizados antes e depois do desafio com veneno. As placas foram sensibilizadas com 5 µg/mL veneno total de *Tityus serrulatus*.

Discussão

Apesar do problema com os escorpiões ter surgido décadas atrás e de já existir um soro anti-escorpiônico, ainda existem consequências graves decorrentes dos acidentes com estes animais.

Existe uma necessidade grande de se estudar mais os venenos dos escorpiões para entendermos melhor todos os processos envolvidos no seu mecanismo de ação e suas consequências nos organismos dos envenenados. Só assim, vamos poder desenvolver um soro de melhor qualidade ou até mesmo uma vacina.

Tendo em vista este objetivo, o presente trabalho aborda dois temas importantes neste contexto. O primeiro é gerar um conhecimento melhor dos componentes do veneno do *Tityus serrulatus*, o principal responsável por acidentes no Brasil, através de uma busca de novas toxinas na biblioteca de cDNA da glândula de veneno deste escorpião. O outro tema está relacionado com o desenvolvimento de novos imunógenos que possam ser usados para a produção de um soro escorpiônico de melhor qualidade.

Este trabalho teve início com a biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *T. serrulatus*. Foram obtidos 634 clones que foram seqüenciados gerando 910 ESTs (Expressed Sequence Tags) ou etiquetas de seqüências expressas. Destas, apenas quinze seqüências (1,6%) eram referentes ao vetor de clonagem sem inserto, mostrando a boa qualidade da biblioteca, uma vez que não houve pré-seleção dos clones com inserto antes do seqüenciamento.

As seqüências foram anotadas com o banco de dados de seqüências de proteínas UniProt. Foram obtidas 43% das seqüências com similaridade com alguma proteína e 57% não apresentaram similaridade com nenhuma proteína do banco de dados analisado. Estes resultados estão de acordo com outros estudos de transcriptoma de animais peçonhentos, com valores de seqüências não anotadas entre 13 a 56% (Kozlov e cols., 2005; Cidade e cols., 2006; Magalhaes e cols., 2006; Pi e cols., 2006; Wagstaff e Harrison, 2006; Zhang e cols., 2006; Schwartz e cols., 2007).

As 910 seqüências foram então agrupadas pelo programa phrap e 400 *uniques* (44% das ESTs) foram obtidas. Castro (2005) obteve uma porcentagem um pouco superior, mas outros trabalhos apresentaram

resultados semelhantes (Zhang e cols., 2006; Schwartz e cols., 2007). Dos *uniques* obtidos 66% não possuíam similaridade, 29% teve similaridade com Uniprot e GOA e 5% teve similaridade com Uniprot, mas não com GOA. Os valores encontrados para as seqüências que apresentam similaridade com os bancos de dados estudados variam entre os estudos de transcriptomas, podendo ser mais que 50% (Junqueira-De-Azevedo e cols., 2002; Cidade e cols., 2006; Zhang e cols., 2006), próximo a 50% (Castro, 2005; Schwartz e cols., 2007) ou até mesmo menores que 50% (Silvestre, 2005). Vários fatores podem estar envolvidos: qualidade da biblioteca, banco de dados usados, tipo de análise bioinformática que foi feita, número de seqüências já descritas para o animal em estudo.

Além da anotação dos *uniques*, também foi realizada uma anotação das seqüências sem agrupá-las, devido à possibilidade da montagem errada de *contigs* pelo uso de poucas seqüências (Mudado, 2007).

Dentre os *uniques*, cerca de 66,3% (265) não apresentavam seqüências idênticas ou similares o suficiente para que fossem reunidos em um grupo de mais de duas seqüências (*singlets*). O restante foi agrupado em 135 grupos ou *contigs* (33,7%). Schwartz e cols. (2007) trabalhando com transcriptoma da glândula de veneno do escorpião *Hadrurus gertschi* obtiveram resultados bastante similares (70,6% de *singlets* e 29,4% de *contigs*).

Apenas 39% dos *contigs* não tinham similaridade com nenhuma proteína do banco de dados, indicando que a maioria dos consensos obtidos são similares a proteínas já descritas. Entretanto, 80% dos *singlets* não tem similaridade, indicando que muitas informações novas podem ser obtidas destas seqüências.

Além disso, resultados obtidos foram bem anotados, ou seja as seqüências parecem ser bem descritas, pois em todas as análises o valor de seqüências que não tinham anotação no GO ficou entre 3-9%.

Comparando as Figuras 23 e 24 (distribuição das ESTs e *uniques* nas classes do *Gene Ontology*), observou-se uma redução da porcentagem das seqüências anotadas em uma dada categoria entre anotação das ESTs e *uniques*. Por exemplo, houve uma diferença de 15% das ESTs para as *uniques* classificadas na função molecular – inibidores de canais iônicos. Este fato se deve à redundância das seqüências, ou seja, existe muitos transcritos de uma mesma

proteína (principalmente toxinas), indicando a tendência de expressão de toxinas e outros componentes da peçonha pela glândula de veneno.

Das seqüências anotadas 45% das ESTs e 21,5% dos *uniques* foram toxinas. Valores semelhantes foram encontrados por Schwartz e cols. (2007) que também trabalharam com transcriptoma de escorpião. Entretanto, transcriptomas de serpentes mostram valores maiores (Junqueira-De-Azevedo e cols., 2002; Cidade e cols., 2006; Zhang e cols., 2006). Isto pode ocorrer porque os venenos de serpentes são muito mais estudados, sendo assim, existe muito mais seqüência de toxinas anotadas. No caso da aranha *Lasiodora sp*, muito pouco estudada, a porcentagem de ESTs com similaridade com toxinas foi muito baixa, cerca de 10% (Silvestre, 2005). Portanto, nossos resultados indicam que devem existir ainda muitas toxinas novas no veneno do *Tityus serrulatus* que ainda não foram anotadas.

Os resultados obtidos com esta análise parcial da biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *T. serrulatus* foram muito promissores, tendo em vista a alta porcentagem de toxinas identificadas dentre os transcritos anotados. Sendo assim, foi tomada a decisão de continuar a análise do transcriptoma de *T. serrulatus* e mais 10.000 clones já foram obtidos e estão sendo seqüenciados para realização de novas análises bioinformáticas.

A segunda parte deste trabalho consistiu no desenvolvimento de novos imunógenos para produção de soro. Sendo assim, foram construídos vários cassetes de expressão que podem gerar proteínas recombinantes com capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra o veneno do *T. serrulatus*.

Para montar os cassetes de expressão foram selecionadas três proteínas do veneno deste escorpião: TsTx, a principal toxina do tipo α do veneno; TsTx-I, principal toxina do tipo β e a TsNTxP, uma proteína não-tóxica, mas que induz produção de anticorpos neutralizantes.

Sendo assim, havia a necessidade de se obter as seqüências de DNA destas proteínas. O cDNA da TsNTxP já havia sido obtido em nosso laboratório (Guatimosim e cols., 1999). Portanto, faltava obter o DNA da TsTx e da TsTs-I. Como suas seqüências de nucleotídeos já haviam sido descritas (Martin-Eauclaire e cols., 1992, 1994), foi possível a construção de primers para tentar obtê-las a partir do DNA genômico do *T. serrulatus*.

Vários trabalhos já descreveram a obtenção de DNA de proteínas seguindo esta metodologia (Corona e cols., Xu e cols., 2005; Silvestre, 2005; Valdez-Cruz e cols., 2007). Mas apesar das seqüências de nucleotídeos das toxinas terem sido obtidas a partir do DNA genômico, houve problemas técnicos com os clones obtidos. Não houve um aprofundamento na resolução destes problemas porque em concomitante a biblioteca de cDNA da glândula de veneno do *T. serrulatus* estava sendo utilizada para a busca de novas seqüências de toxinas. Portanto, as seqüências das toxinas de interesse também foram obtidas por meio desta metodologia. E os clones obtidos não apresentaram problemas de manipulação e por isso foram usados nas etapas seguintes.

Durante os processos de clonagem ocorreu um fato interessante: a ligação de 2 cópias do DNA da TsTx-I por meio dos seus sítios de restrição e sua posterior ligação no vetor de clonagem pBluescript, o que facilitou o trabalho de construção dos cassetes. Apesar deste fenômeno parecer raro, a sua ocorrência pode ser freqüente, mas pouco relatado, porque normalmente não é um resultado que busca-se obter.

Dos cassetes construídos, duas construções foram selecionadas para a expressão: a TsTx-I com 1 e 2 cópias. A utilização dos demais cassetes não foi iniciada devido ao fator limitante “tempo/prazo”, porém, um importante material foi construído e se encontra disponível no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares.

A lógica em se expressar duas cópias da mesma toxina juntas é devido a seu pequeno tamanho (7 kDa). É conhecido que proteínas pequenas expressas no citoplasma de bactérias tendem a ser instáveis principalmente por causa da sua rápida degradação por enzimas proteolíticas da bactéria hospedeira (Rabbani e cols., 1988; Parsell e cols., 1984).

Para evitar esse problema, os peptídeos e proteínas pequenas têm sido freqüentemente produzidos como proteínas de fusão. Entretanto, a principal desvantagem desta técnica para a produção em larga escala é que o produto desejado constitui somente uma pequena porção das proteínas de fusão, uma vez que nos sistemas comerciais disponíveis as proteínas utilizadas como carreadoras são muito grandes com 30-50 kDa (Ishikawa & Tamaoki, 1996).

Por isso, a fusão de várias cópias de uma mesma proteína vem sendo usada para suplantar este problema. Este método traz mais estabilidade para a proteína a ser expressa, sem precisar de uma proteína carreadora; e vem obtendo muitos resultados positivos com a expressão da calcitonina (Gigova e cols., 1989; Ishikawa & Tamaoki, 1996).

O sistema de expressão escolhido foi o bacteriano, por ser barato, simples e ter muitas ferramentas disponíveis (Villaverde & Currió, 2003). O vetor escolhido foi o pET 11a por já possuímos no laboratório e por apresentar bons resultados em expressão anterior de toxina feita pelo nosso grupo (Araújo, 2004) e pelo fato de 90% das publicações sobre proteínas recombinantes, usarem o vetor pET (Sorensen & Mortensen, 2005a). A linhagem BL21(DE3) foi selecionada por possuir deficiência de dois genes de proteases citoplasmáticas e por ter se mostrado eficiente em expressões de diversas proteínas (Cho e cols., 2007; Medynski e cols., 2007; Yang e cols., 2007; Warner e cols., 2007).

Inicialmente, houve problemas para expressar as proteínas recombinantes, pois algumas colônias não expressavam. Isto pode ter ocorrido devido à instabilidade do plasmídeo de se manter na bactéria devido à toxicidade do produto a ser expresso ou mesmo mutações nas regiões reguladoras do plasmídeo, perda e/ou redução na expressão da RNA polimerase T7, dentre outros. Dumon & Seignover (2004) expressando 26 produtos diferentes, demonstraram que 96% deles foram tóxicos para a BL21(DE3).

Uma solução para este problema é o uso de bactérias mutantes, tais como a C41(DE3) e C43(DE3) mutantes da BL21(DE3) que são citadas como sendo muito mais eficientes na expressão de produtos tóxicos (Dumon & Seignover, 2004). Mas seu uso requer um considerável investimento (custo para compra). Além disso, como havia um prazo a cumprir, não seria possível esperar os trâmites da importação, que estão sendo demasiadamente demorados. Sendo assim, a expressão de colônias recém-transformadas e a verificação de quais delas estavam expressando foi a solução dada para o problema.

As proteínas recombinantes foram expressas como corpos de inclusão. Existem diversos trabalhos descrevendo este tipo de expressão tanto com o

vetor pET 11a como para outros tipos de pET (Turkov e cols., 1997; Roberto e cols., 2004; Zhao e cols., 2007; Kou e cols., 2007). Os corpos de inclusão ocorrem por deposição de polipeptídeos com enovelamento errados ou parciais, que expõe regiões hidrofóbicas e permite interações intermoleculares (Villaverde & Carrió, 2003).

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

Como a obtenção de proteínas recombinantes solúveis durante a expressão é um processo mais barato e rápido, esta estratégia foi utilizada inicialmente.

Tanto a TsTx-I₍₁₎ como a TsTx-I₍₂₎ foram expressas como corpos de inclusão, mas com algumas diferenças. Uma fração da TsTx-I₍₁₎ foi expressa de maneira solúvel dentro das células. O manual do sistema pET (2005) afirma que em casos de proteínas expressas como corpos de inclusão é comum que uma parte seja solúvel. Já a TsTx-I₍₂₎ não expressou de maneira solúvel perceptível por análise em gel de poliacrilamida. Sendo assim, as tentativas de obter uma proteína solúvel se concentraram nesta proteína.

A agregação pode ser minimizada por controle de parâmetros do processo de expressão, tais como, redução da temperatura, redução da taxa de expressão do gene recombinante, expressão em meios mais ricos, modificações nos níveis de oxigênio e fonte de carbono, linhagens bactérias diferentes, baixos níveis de indução, dentre outros (Moore e cols., 1993; Weickert e cols., 1996; Villaverde & Carrió, 2003; Sorensen & Mortensen, 2005a).

A TsTx-I₍₂₎ foi expressa a 25°C e 30°C, mas as proteínas ainda continuavam insolúveis e além disso o nível de expressão caiu muito. Liu e colaboradores (2006) relataram a produção de corpos de inclusão a 25°C.

Também foi testado diminuir a produção da proteína expressa, pois a redução da concentração celular pode favorecer seu enovelamento e diminuir a agregação. Isto pode ser conseguido utilizando níveis de indução baixos, diminuindo a concentração final do IPTG. Utilizando concentrações de 0,1 mM e 0,05 mM de IPTG não foi obtida nenhuma melhora na solubilização da

proteína recombinante, mesmos com a redução da expressão. Resultados similares foram obtidos por Liu e cols. (2006).

A utilização de um meio de cultura mais rico também não favoreceu a formação da proteína TsTx-I₍₂₎ solúvel. Moore e cols.(1993) demonstraram que meios mais ricos favorecem a produção de proteínas solúveis, mas há relatos que indicam que o uso de meios mínimos reduz a expressão da proteína recombinante, diminuindo assim a agregação (Manual pET Systems, 2005).

Condições dos meios de cultivos, tais como o requerimento de nutrientes é um controle limitante do crescimento durante o processo de expressão, esta limitação freqüentemente leva a mudanças no meio de crescimento, tais como alterações de pH e concentração de oxigênio dissolvido (Sorensen & Mortense, 2005a). Estas alterações podem ter influência na expressão e afetar a solubilidade dos produtos a serem expressos (Weickert e cols., 1996). Portanto, foi feita uma expressão da TsTx-I₍₂₎ em fermentador com as condições controladas, mas mesmo assim não houve alteração significativa na solubilidade da proteína recombinante.

Villaverde e Carrió (2003) afirmam que este tipo de estratégia não resulta em um mesmo grau de sucesso para diferentes proteínas, devido às características bioquímicas de cada uma e que este é um processo de tentativa e erro.

Como não foi possível obter a proteína recombinante de maneira solúvel com a primeira estratégia, um processo diferente foi testado: a obtenção da proteína solúvel a partir dos corpos de inclusão. Estes podem ser solubilizados por uso de desnaturantes, como uréia e guanidina-HCl; uso de pH extremo e temperatura adequada ou uso de detergentes, tais como SDS e CTAB (Clark e cols., 2001; Villaverde & Carrió, 2003).

A TsTx-I₍₂₎ foi solubilizada efetivamente pelo uso de uréia 6 M e SDS 10%. Resultados semelhantes foram obtidos para outras proteínas recombinantes expressas no mesmo sistema (Cho e cols., 2007; Afzal e cols., 2007; Galluccio e cols., 2007; Zhao e cols. 2007).

O SDS foi escolhido como agente solubilizante, pois seu uso tem a vantagem de obter a proteína de maneira ativa em muitos casos (Clark e cols., 2001). Mas como o detergente pode atrapalhar nos passos de purificação por cromatografia ele deve ser removido. Portanto, após solubilização foi feita uma

diálise para tentar remover o SDS, mas em todas as condições testadas a proteína recombinante voltava para a forma insolúvel durante o processo.

Sendo assim, a solubilização com uréia foi testada, mas o uso da diálise para sua posterior remoção, apresentou o mesmo problema descrito acima. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhao e cols. (2007). Em dois trabalhos, os pesquisadores obtiveram sucesso em remover a uréia, diminuindo sua concentração como foi feito neste trabalho, mas como as proteínas expressas tinham cauda de histidina, elas foram imobilizadas na resina de níquel durante o processo, o que pode ter levado aos bons resultados apresentados (Kou e cols., 2007; Kirabakaran e cols., 2007).

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

Harlow e Lane (1988) mostraram que se pode usar os corpos de inclusão para a produção de anticorpos e posteriormente, Vuillard e Freeman (<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.nwfsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>) confirmaram este resultado. Como a produção de proteínas recombinantes neste trabalho tem essa finalidade, decidiu-se utilizar os corpos de inclusão para as imunizações.

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

No nosso caso, havia muitas proteínas contaminantes junto com a proteína de interesse. A utilização de detergentes pode retirar as proteínas que precipitam junto. Os CI foram lavados com 0,5% de Triton X-100, e foi observado que uma parte pequena das proteínas contaminantes era removida. Este resultado indicou que a maioria das proteínas que estavam nos CI era

parte integral deles e deviam estar ligadas com a proteína de interesse por ligações intermoleculares.

De acordo com os resultados obtidos anteriores de solubilização dos CI, o tiocianato de guanidina não solubilizava a TsTx-I₍₂₎, mas solubilizava a maioria das proteínas contaminantes. O pellet insolúvel resultante mostrou um grau de pureza da TsTx-I₍₂₎ suficiente para as imunizações. E tinha uma vantagem adicional, não apresentava toxicidade.

No caso da TsTx-I₍₁₎, como uma fração foi expressa solúvel, inicialmente tentou-se obtê-la pura por meio de cromatografia em HPLC. Mas a solubilização dos CI com acetato de sódio pH 5,2 se mostrou uma metodologia mais rápida e eficiente. A fração solúvel obtida por este processo foi dialisada para remoção do acetato, mas durante a diálise uma parte da TsTx-I₍₁₎ se tornou insolúvel, o que não impossibilitou o seu uso para as imunizações. Sendo assim, a TsTx-I₍₁₎ solúvel/insolúvel foi usada como imunógeno, e também não foi tóxica, indicando que a fração que estava solúvel não devia estar na conformação ideal da toxina TsTx-I.

Um resultado que deve ser discutido é o surgimento da proteína ou fragmento contaminante de 14 kDa durante a lise bacteriana. Analisando os resultados obtidos, parece que o seu surgimento se deve ao processo mecânico, uma vez que a lisozima e inibidores de protease e de oxidação não têm efeito.

Nos extratos de todas as expressões feitas, existe uma proteína de aproximadamente 30 kDa que foi muito expressa. Como a proteína de 14 kDa aparece em grandes quantidades e como a única outra proteína que está representada no extrato bacteriano em quantidades grandes é a proteína de 30 kDa, pode ser que seja esta proteína que está sendo quebrada durante a lise e o fragmento resultante é a proteína de 14 kDa. A proteína de 30 kDa pode ser a β -lactamase, que em sistemas pET que utilizam ampicilina é expressa em quantidades apreciáveis e tem tamanho de aproximadamente 32 kDa (Manual pET Systems, 2005). Para se ter certeza sobre a origem da proteína de 14 kDa seria necessário um seqüenciamento de proteína, para se determinar sua seqüência de aminoácidos.

Outro ponto a ser discutido é a diferença na expressão das duas proteínas recombinantes. A TsTx-I₍₂₎ foi expressa em quantidades maiores (30

mg/L) que a TsTx-I₍₁₎ (20 mg/L), cerca de 30% a mais. Isto pode ser devido ao aumento do tamanho da proteína expressa que levou a uma maior estabilidade. Para o gene da calcitonina, uma proteína de 32 aminoácidos (a metade de aminoácidos da TsTx-I), foi demonstrado que a expressão de genes multiméricos (em tandem), estabiliza a proteína e consequentemente gera uma quantidade maior de proteína expressa (Gigova e cols., 1989; Ishikawa & Tamaoki, 1996).

Após a imunização de coelhos e camundongos, eles foram sangrados e o soro foi titulado por ELISA. O coelho imunizado com o veneno de *Tityus serrulatus* produziu uma quantidade suficiente de anticorpos específicos após 6 doses de 100 µg de veneno. Já os coelhos imunizados com a TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎, que receberam uma quantidade de proteína semelhante ao coelho imunizado com veneno, não apresentaram uma boa resposta contra o veneno de *T. serrulatus*. Legros e colaboradores (2002) produziram uma proteína quimérica com toxinas do veneno do *Androctonus australis* Hector, MBP-AaH I + AaH II, e os anticorpos produzidos com ela reconheceram bem a proteína quimérica, mas não as proteínas nativas.

Alguns pontos devem ser ponderados. Primeiramente, as proteínas utilizadas para as imunizações não estão completamente puras, sendo assim, anticorpos contra as proteínas bacterianas contaminantes também vão ser produzidos. Portanto, o soro vai ter uma proporção menor de anticorpos contra a proteína recombinante, que teria se ela estivesse pura, levando a um menor reconhecimento do veneno de *T. serrulatus* pelos anticorpos anti-toxinas recombinantes do que o esperado.

Existe outro ponto relevante que é a composição do veneno, a TsTx-I é apenas um componente dele, sendo assim anticorpos feitos utilizando ela como imunógeno podem não ser capazes de um reconhecimento total do veneno.

Além disso, no veneno de *Tityus serrulatus*, existem toxinas que agem em canais de sódio do tipo α e β (a TsTx-I pertence ao segundo grupo) e De Lima e cols. (1993) demonstraram que anticorpos anti-toxinas α não reconhecem toxinas do tipo β e vice-versa. Entretanto, anticorpos anti-TsNTxP reconhecem os dois tipos de toxinas e possuem um reconhecimento do veneno

total de *T. serrulatus* muito similar ao apresentado pelos anticorpos anti-veneno. Anticorpos anti-TsNTxP também reconhecem muito bem a TsTx, mas reconhecem 2 vezes menos a TsTx-I (Moreira-Ferreira e cols., 1998).

Também para os camundongos foi obtido um baixo título dos soros anti-toxinas recombinantes frente ao veneno total. Mas eles foram imunizados com uma quantidade menor de proteínas (o número de doses foi menor) e os soros obtiveram um título melhor do que os soros dos coelhos. Isto pode ser devido às diferenças do sistema imune das duas espécies e das características dos imunógenos utilizados. Calderon-Aranda e colaboradores (1999) imunizando coelhos e camundongos com peptídeos sintéticos demonstraram que os últimos responderam pior aos imunógenos usados. Já Mendes e colaboradores (2004) demonstraram que os camundongos respondiam melhor que os coelhos quando a TsNTxP/MBP foi utilizada como imunógeno.

Apesar do baixo título dos soros dos coelhos imunizados com TsTx-I₍₁₎ e ₍₂₎, eles foram capazes de proteger *in vitro*, animais desafiados com 1 e 2 DL₅₀ do veneno do *Tityus serrulatus*. Outros trabalhos também demonstraram que apesar do título dos soros obtidos estar baixo frente ao veneno ou toxina usado para o desafio; os soros foram capazes de neutralizar seus efeitos tóxicos (Calderon-Aranda e cols., 1995; Garcia e cols., 2003). Isto se deve a qualidade dos anticorpos. Foram feitos poucos anticorpos (título baixo), mas com uma qualidade boa, ou seja, com grande especificidade ao veneno total.

O soro anti-TsTx-I₍₂₎ foi mais eficiente na proteção dos animais desafiados com 2DL₅₀ do veneno do que o soro anti-TsTx-I₍₁₎. Isto pode ser devido à diferença de reconhecimento dos soros frente ao veneno, o soro anti-TsTx-I₍₂₎ apresentou um título melhor, indicando que havia uma concentração maior de anticorpos específicos para o veneno.

Outro resultado interessante obtido na neutralização *in vitro* foi a obtenção do mesmo nível de proteção quando quantidades diferentes dos soros foi utilizada (100 e 200 µl), indicando que os epitopos que são bloqueados já tinham sido saturados de anticorpos com a primeira dose (Tabela 10).

Esse resultado gera novas perguntas em relação aos mecanismos de neutralização do veneno de *Tityus serrulatus*. Mendes e cols. (2004) demonstraram que animais de espécies diferentes imunizados com uma

mesma proteína (TsNTxP recombinante) produzem anticorpos que reconhecem epitopos diferentes (peptídeos sintéticos imobilizados). Portanto, a realização de novos ensaios é necessária para um entendimento melhor deste processo.

Quanto à neutralização *in vivo*, foram obtidos melhores resultados de proteção neste ensaio. Todos animais foram protegidos com 2 DL₅₀. Em trabalhos utilizando toxinas ou derivados delas como imunógenos normalmente os melhores resultados são obtidos com a neutralização *in vitro* (Calderon-Aranda e cols., 1995, 1999; Garcia e cols., 2003). Já Morreira-Ferreira e cols. (1998) utilizando a TsNTxP também obtiveram melhores resultados *in vivo*. Isto sugere que os nossos imunógenos têm grande potencial para produção de vacina.

Na neutralização *in vivo*, dois camundongos do grupo imunizado com a TsTx-I₍₁₎ morreram 30 horas após o desafio. Estes animais eram os mais pesados e como eles eram adultos no início do experimento; o aumento de peso se deve principalmente ao aumento de gordura corporal.

Segundo a farmacodinâmica, substâncias circulantes no sangue têm pouca penetração no tecido adiposo, por este possuir poucos vasos sanguíneos. Por isso, para fins práticos, a distribuição ao tecido adiposo corporal após administração aguda só é importante para algumas substâncias altamente lipossolúveis (Rang e cols., 1997). Sendo assim, não devemos levar em conta o aumento de peso global do camundongo, pois grande parte é gordura, e esta não terá influência na ação do veneno. Como não encontramos um meio seguro para calcular quanto do aumento de peso devia-se a aumento de gordura, escolhemos um valor aleatório (60%), mas que pode não ter sido suficiente. Portanto, o fato dos animais mais pesados morrerem pode ser consequência dos animais obesos ter recebido uma quantidade maior do veneno do que 2 DL₅₀ ou dos aspectos da obesidade que dificultaram o metabolismo e eliminação das toxinas. Santana e colaboradores (1996) estudaram alguns parâmetros farmacocinéticos do veneno do *T. serrulatus* e demonstraram que o veneno tem taxa de absorção rápida, alta e rápida distribuição pelos tecidos, grande afinidade para os tecidos e lenta meia-vida de eliminação.

Um resultado que vale a pena ser comentado é o título dos soros dos camundongos 72 horas após o desafio em comparação com o título antes do desafio. Para os camundongos imunizados com o veneno, o título é menor depois do desafio, o que está de acordo com o pensamento lógico que uma parte dos anticorpos são perdidos por se ligarem às toxinas do veneno durante o desafio. Mas para os animais imunizados com a TsNTxP/MBP recombinante, o título se manteve inalterado e para as proteínas recombinantes, TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎ ocorreu o contrário. No segundo caso, o que pode ter ocorrido é que uma semana antes do desafio todos os animais receberam mais uma dose de imunógeno, mas no caso dos imunizados com TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎ como o título estava um pouco baixo, foi injetado 2 vezes mais imunógeno. Sendo assim, o aumento da dose do imunógeno pode ter refletido em um aumento do título após o desafio, mas como o sangue dos camundongos não foi retirado depois do último reforço, não há como se concluir sobre o fato. Assim este aumento pode ter ocorrido devido a uma produção maior de anticorpos anti-TsTx-I_(1 e 2) causada pelo último reforço ou a uma produção de anticorpos anti-veneno causada pela injeção de veneno no desafio. Novos ensaios devem ser realizados para a confirmação do fato e para se determinar sua causa.

Neste trabalho, mais de um veneno de *Tityus serrulatus*, que seria utilizado nos ensaios de neutralização, foi analisado. Inicialmente, um pool de veneno bruto (sem liofilizar) foi caracterizado. Este veneno apresentou uma DL₅₀ mais baixa do que normalmente é encontrado: 6,07 µg/20g. Um outro pool de veneno já liofilizado há algum tempo foi testado e uma DL₅₀ de 14,07 µg/20g foi obtida. Vários trabalhos que usaram venenos de *T. serrulatus* liofilizados apresentaram resultados similares ao obtido (Chávez-Olórtegui e cols., 1997; Mendes e cols., 2004). Kalapothakis e Chávez-Olórtegui (1997) demonstraram que venenos que continham mais toxinas do tipo α eram mais tóxicos, com DL₅₀ de 6,19 µg/20g. Segundo este trabalho venenos com alta ou moderada concentração de toxina β e moderada ou baixa quantidade de toxina α possuem valor de DL₅₀ próximo ao veneno bruto liofilizado há mais tempo, 12,48 µg/20g. O que pode justificar os resultados obtidos.

Entretanto, para verificar se o processo de liofilização acarreta alguma alteração na toxicidade do veneno, uma quantidade determinada de veneno

bruto foi liofilizada e ressuspendida em água para se obter a mesma concentração de antes. O veneno liofilizado foi dosado e se observou que proteínas foram perdidas durante o processo, cerca de 30%. Isto pode ser devido a perdas durante a manipulação. A DL_{50} para o veneno bruto liofilizado foi de 6,9 $\mu\text{g}/20\text{g}$, ligeiramente maior que para o veneno bruto *in natura*. Sendo assim, a liofilização tem pouca ação na toxicidade global do veneno, mas o tempo que o veneno já está liofilizado tem grande influência.

Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que a toxina TsTx-I recombinante tem capacidade de gerar anticorpos que neutralizam as ações do veneno total do *Tityus serrulatus*. A grande homologia apresentada por todas as toxinas escorpiônicas (Figuras 3 a 6) pode explicar, ao menos em parte, como uma única toxina pode gerar anticorpos que possam neutralizar os efeitos do veneno total. As toxinas mais potentes do *T. serrulatus* apresentam uma similaridade de estrutura primária de 40 a 70% (Figura 7). A determinação da estrutura tridimensional das proteínas recombinantes TsTx-I obtidas neste trabalho seria fundamental para entender melhor esta capacidade de gerar anticorpos neutralizantes.

Conclusões

- A biblioteca da glândula de veneno do *Tityus serrulatus* está com uma boa qualidade e nos forneceu grande quantidade de informações a respeito de novas toxinas ainda não descritas, determinação de seqüência de nucleotídeos de toxinas que só tem conhecida a seqüência de aminoácidos e novas informações sobre as toxinas mais conhecidas, como a existência de isoformas;
- As construções TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎ foram expressas com sucesso no sistema pET e a estratégia de tandem trouxe mais estabilidade para a proteína recombinante;
- As proteínas foram expressas de maneira insolúvel em corpos de inclusão, mas elas podem ser usadas desta maneira para produzir anticorpos;
- As proteínas recombinantes produziram anticorpos neutralizantes que protegiam tanto *in vitro* quanto *in vivo*, animais desafiados com 2 DL₅₀ do veneno de *T. serrulatus*;
- O avanço mais importante obtido a partir deste trabalho foram as informações acerca da capacidade de produção de anticorpos neutralizantes da toxina TsTx-I, que ainda não tinha sido estudada neste contexto;
- Os resultados de neutralização trouxeram novas informações a respeito deste processo e demonstraram que as pesquisas nesta área deve continuar;
- Os resultados promissores descritos neste trabalho reforçam a importância da geração de novos imunógenos para produção de soro anti-escorpionicó.

Perspectivas

- Finalização do transcriptoma da biblioteca da glândula de veneno do *T. serrulatus*;
- Avaliar e testar novas toxinas obtidas da biblioteca para uso na produção de anticorpos neutralizantes;
- Produção de proteínas recombinantes com os outros cassetes construídos;
- Verificação se os efeitos de proteção dos anticorpos anti-TsNTxPrec e anti-TsTx-Irec são somatórios;
- Produção das proteínas TsTx-I₍₁₎ e TsTx-I₍₂₎ de maneira solúvel e com enovelamento o mais próximo do correto para verificar se existe diferença na produção de anticorpos (anticorpos contra estruturas terciárias);
- Determinar a estrutura tridimensional das proteínas recombinantes obtidas neste trabalho;
- Testar as atividades biológicas das proteínas recombinantes obtidas.

Referências

- ADAM, K. R. e WEISS, C. The occurrence of 5-hidroxytryptamine in scorpion venom. J. Exp. Biol., v.35, p.39-41. 1958.
- AFZAL, A. J. e LIGHTFOOT, D. A. Soybean disease resistance protein RHG1-LRR domain expressed, purified and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies: preparation for a functional analysis. Protein Expr Purif., v.53, n.2, Jun, p.346-55. 2007.
- ALAMI, M.; VACHER, H.; BOSMANS, F.; DEVAUX, C.; ROSSO, J. P.; BOUGIS, P. E.; TYTGAT, J.; DARBON, H. e MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Characterization of Amm VIII from *Androctonus mauretanicus mauretanicus*: a new scorpion toxin that discriminates between neuronal and skeletal sodium channels. Biochem J., v.375, n.Pt 3, Nov 1, p.551-60. 2003.
- ALI, S. A.; STOEVA, S.; SCHUTZ, J.; KAYED, R.; ABASSI, A.; ZAIDI, Z. H. e VOELTER, W. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol., v.121, n.4, Dec, p.323-32. 1998.
- ALMEIDA, A. P.; ALPOIM, N. C. e FREIRE-MAIA, L. Effects of a purified scorpion toxin (tityustoxin) on the isolated guinea pig heart. Toxicon, v.20, n.5, p.855-65. 1982.
- ALTSCHUL, S. F. e LIPMAN, D. J. Protein database searches for multiple alignments. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.14, Jul, p.5509-13. 1990.
- ALVARENGA, L. M.; DINIZ, C. R.; GRANIER, C. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. Toxicon, v.40, n.1, Jan, p.89-95. 2002.
- ALVARENGA, L. M.; MACHADO DE AVILA, R. A.; AMIM, P. R.; MARTINS, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. G.; GRANIER, C. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, v.46, n.6, Nov, p.664-71. 2005.
- ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; SAMPAIO, S. V. e GIGLIO, J. R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. Toxicon, v.27, n.8, p.907-16. 1989.
- ARANTES, E. C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S. V.; VIEIRA, C. A. e GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. Biochim Biophys Acta, v.1199, n.1, Jan 5, p.69-75. 1994.

ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; VIEIRA, C. A. e GIGLIO, J. R. What is tityustoxin? Toxicon, v.30, n.7, Jul, p.786-9. 1992.

ARAÚJO, S. C. Clonagem, expressão e caracterização de toxinas das aranhas *Phoneutria nigriventer* e *Loxosceles intermedia*. Departamento de Farmacologia, UFMG, Belo Horizonte, 2005. 183 p.

AUBREY, N.; DEVAUX, C.; SIZARET, P. Y.; ROCHAT, H.; GOYFFON, M. e BILLIALD, P. Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. Cell Mol Life Sci, v.60, n.3, Mar, p.617-28. 2003.

AUBREY, N.; MUZARD, J.; CHRISTOPHE PETER, J.; ROCHAT, H.; GOYFFON, M.; DEVAUX, C. e BILLIALD, P. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aahl, and functional evaluation versus other antibody fragments. Toxicon, v.43, n.3, Mar 1, p.233-41. 2004.

AZEVEDO, A. D.; SILVA, A. B.; CUNHA-MELO, J. R. e FREIRE-MAIA, L. Cardiovascular and respiratory effects induced by a purified scorpion toxin (tityustoxin) in unanesthetized rats. Toxicon, v.21, n.6, p.753-9. 1983.

BAHRAOUI, E.; EL AYEB, M.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H. e GRANIER, C. Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: study with synthetic peptides of the antigenicity of four regions of toxin II of *Androctonus australis Hector*. Mol Immunol, v.23, n.4, Apr, p.357-66. 1986.

BAHRAOUI, E.; PICHON, J.; MULLER, J. M.; DARBON, H.; ELAYEB, M.; GRANIER, C.; MARVALDI, J. e ROCHAT, H. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. J Immunol, v.141, n.1, Jul 1, p.214-20. 1988.

BALAZET, L. Scorpionism in the old world. In: W. Bücherl e E. E. Buckley (Ed.). Venomous Animals and Their Venoms. New York: Academic Press, v.3, 1971. Scorpionism in the old world, p.349-371

BARHANIN, J.; GIGLIO, J. R.; LEOPOLD, P.; SCHMID, A.; SAMPAIO, S. V. e LAZDUNSKI, M. Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. J Biol Chem, v.257, n.21, Nov 10, p.12553-8. 1982.

BARHANIN, J.; ILDEFONSE, M.; ROUGIER, O.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R. e LAZDUNSKI, M. Tityus gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. Pflugers Arch, v.400, n.1, Jan, p.22-7. 1984.

BARRIO, A. e VITAL-BRAZIL, G. Ein neues Verfahren der Giften Nahme ber Spinnen. Experientia, v.6, p.112-113. 1949.

BARROS, E. F. Aspectos anatomopatológicos do sistema nervoso central na intoxicação escorpiônica. O Hospital, n.3, p.423. 1937.

BARROS, E. F. Aspectos clínicos da intoxicação escorpionica. Mem. Inst. Biol. Ezequiel Dias, n.Tomo II, p.103. 1938.

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

BECERRIL, B.; CORONA, M.; MEJIA, M. C.; MARTIN, B. M.; LUCAS, S.; BOLIVAR, F. e POSSANI, L. D. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. FEBS Lett, v.335, n.1, Nov 29, p.6-8. 1993.

BECERRIL, B.; MARANGONI, S. e POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. Toxicon, v.35, n.6, Jun, p.821-35. 1997.

BECHIS, G.; SAMPIERI, F.; YUAN, P. M.; BRANDO, T.; MARTIN, M. F.; DINIZ, C. R. e ROCHAT, H. Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. Biochem Biophys Res Commun, v.122, n.3, Aug 16, p.1146-53. 1984.

BLANC, E.; LECOMTE, C.; RIETSCHOTEN, J. V.; SABATIER, J. M. e DARBON, H. Solution structure of TsKapa, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca(2+)-activated K⁺ channels. Proteins, v.29, n.3, Nov, p.359-69. 1997.

BLAST. Basic alignment Search Tool. NCBI: Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acessado em janeiro de 2005 e agosto de 2007.

BLAUSTEIN, M. P.; ROGOWSKI, R. S.; SCHNEIDER, M. J. e KRUEGER, B. K. Polypeptide toxins from the venoms of Old World and New World scorpions preferentially block different potassium channels. Mol Pharmacol, v.40, n.6, Dec, p.932-42. 1991.

BOSMANS, F. e TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. Toxicon, v.49, n.2, Feb, p.142-58. 2007.

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

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

BRAVO-BECHERELLE, M. A. e MAZZOTTI, L. [Geographic distribution of mortality from scorpion stings in Mexico.]. Rev Inst Salubr Enferm Trop, v.21, Dec, p.129-40. 1961.

BÜRCHEL, W. Venomous animals and their venoms. In: W. Burcherl e E. Buckley (Ed.). New York: Academic Press, v.111, 1971. Venomous animals and their venoms, p.317-348

BUTANTAN. Soro anti-escorpiônico. Disponível em: <<http://www.vacinas.org.br/vacinas26.htm>>. Acesso em: agosto de 2007.

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

CALDERON-ARANDA, E. S.; SELISKO, B.; YORK, E. J.; GURROLA, G. B.; STEWART, J. M. e 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, v.264, n.3, Sep, p.746-55. 1999.

CAO, Z. Y.; MI, Z. M.; CHENG, G. F.; SHEN, W. Q.; XIAO, X.; LIU, X. M.; LIANG, X. T. e YU, D. Q. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensi* Karch. J Pept Res, v.64, n.1, Jul, p.33-41. 2004.

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

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

CASTRO, C. S. Análises bioinformáticas de transcritos da glândula de veneno da aranha-marrom *Loxocles intermedia* e construção de baculovírus recombinantes como vetores de toxinas inseticidas. Departamento de Ciências Biológicas, UFOP, Ouro Preto, 2005. 181 p.

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

CHALLA, S.; BARRETTE, R.; ROOD, D.; ZINCKGRAF, J.; FRENCH, R. e SILBART, L. Non-toxic *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. Vaccine, v.25, n.17, Apr 30, p.3328-37. 2007.

CHAVES-OLORTEGUI, C.; FERREIRA, A. M.; CORDEIRO, M. N.; MARIA, W. S.; RICHARDSON, M. e DINIZ, C. R. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello Campos, 1922). In: C. Bon e M. Goyffon (Ed.). Envenoming and their treatment. Paris: Fondation Marcel Mérieux, 1996. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello Campos, 1922), p.183-195

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARA, D. A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C. e GRANIER, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. Vaccine, v.9, n.12, Dec, p.907-10. 1991.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; FERREIRA, A. M.; FERREIRA, A. P. e DINIZ, C. R. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. Toxicon, v.35, n.2, Feb, p.213-21. 1997.

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

CHO, D.; SHIN, S. J.; TALAAT, A. M. e COLLINS, M. T. Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. Protein Expr Purif, v.53, n.2, Jun, p.411-20. 2007.

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

CIDADE, D. A.; SIMAO, T. A.; DAVILA, A. M.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L.; HO, P. L.; BON, C.; ZINGALI, R. B. e ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. Toxicon, v.48, n.4, Sep 15, p.437-61. 2006.

CLARK, E. D. Protein refolding for industrial processes. Curr Opin Biotechnol, v.12, n.2, Apr, p.202-7. 2001.

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

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

CORONA, M.; GURROLA, G. B.; MERINO, E.; CASSULINI, R. R.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GARCIA, B.; RAMIREZ-DOMINGUEZ, M. E.; CORONAS, F. I.; ZAMUDIO, F. Z.; WANKE, E. e POSSANI, L. D. A large number of novel

Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. FEBS Lett, v.532, n.1-2, Dec 4, p.121-6. 2002.

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

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; VILLEGAS, E.; BARNHAM, K. J.; HE, W.; NORTON, R. S. e NAKAJIMA, T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochem J, v.359, n.Pt 1, Oct 1, p.35-45. 2001.

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

COUTINHO-NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da tityustoxina. Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, 1975.

CRAIK, D. J. e DALY, N. L. Oxidative folding of the cystine knot motif in cyclotide proteins. Protein Pept Lett, v.12, n.2, Feb, p.147-52. 2005.

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

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

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

DE LIMA, M. E.; COURAUD, F.; HUE, B.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; LAPIED, B.; PELHATE, M.; DINIZ, C. R. e ROCHAT, H. "Insect toxins" from scorpion venoms as tools for the study of the sodium channel of insects. Pesticide Sci., v.24, n.3, p.284. 1988.

DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; HUE, B.; LORET, E.; DINIZ, C. R. e ROCHAT, H. On the binding of two scorpion toxins to the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. Insect Biochemistry, v.19, p.413. 1989.

DE LIMA, M. E.; MARTIN, M. F.; DINIZ, C. R. e ROCHAT, H. *Tityus serrulatus* toxin VII bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect toxin from scorpion venoms. Biochem Biophys Res Commun, v.139, n.1, Aug 29, p.296-302. 1986.

DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R. e GRANIER, C. *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. Toxicon, v.31, n.2, Feb, p.223-7. 1993.

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

DEBONT, T.; SWERTS, A.; VAN DER WALT, J. J.; MULLER, G. J.; VERDONCK, F.; DAENENS, P. e TYTGAT, J. Comparison and characterization of the venoms of three *Parabuthus* scorpion species occurring in southern Africa. Toxicon, v.36, n.2, Feb, p.341-52. 1998.

DEHESA-DAVILA, M. e POSSANI, L. D. Scorpionism and serotherapy in Mexico. Toxicon, v.32, n.9, Sep, p.1015-8. 1994.

DELABRE, M. L.; PASERO, P.; MARILLEY, M. e BOUGIS, P. E. Promoter structure and intron-exon organization of a scorpion alpha-toxin gene. Biochemistry, v.34, n.20, May 23, p.6729-36. 1995.

DELORI, P.; VAN RIETSCHOTEN, J. e ROCHAT, H. Scorpion venoms and neurotoxins: an immunological study. Toxicon, v.19, n.3, p.393-407. 1981.

DEVAUX, C.; CLOT-FAYBESSE, O.; JUIN, M.; MABROUK, K.; SABATIER, J. M. e ROCHAT, H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. FEBS Lett, v.412, n.3, Aug 4, p.456-60. 1997.

DEVAUX, C.; MOREAU, E.; GOYFFON, M.; ROCHAT, H. e BILLIALD, P. Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin Aahl from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. Eur J Biochem, v.268, n.3, Feb, p.694-702. 2001.

DEVAUX, J.; GOLLA, M.; JACQUET, G. e CREST, M. Effects of K⁺ channel blockers on developing rat myelinated CNS axons: identification of four types of K⁺ channels. J Neurophysiol, v.87, n.3, Mar, p.1376-85. 2002.

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

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

DINIZ, C. R.; PIMENTA, A. F.; NETTO, J. C.; POMPOLO, S.; GOMEZ, M. V. e BOHM, G. M. Effect of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (Tityustoxin) on

the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. Experientia, v.30, n.11, Nov 15, p.1304-5. 1974.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G. e VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). Protein Expr Purif, v.37, n.1, Sep, p.203-6. 2004.

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

EL AYEB, M.; DARBON, H.; BAHRAOUI, E. M.; VARGAS, O. e ROCHAT, H. Differential effects of defined chemical modifications on antigenic and pharmacological activities of scorpion alpha and beta toxins. Eur J Biochem, v.155, n.2, Mar 3, p.289-94. 1986.

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. e DE WAARD, M. Synthesis, ¹H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins. J Biol Chem, v.275, n.18, May 5, p.13605-12. 2000.

FERREIRA, L. A.; ALVES, E. W. e HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, v.31, n.8, Aug, p.941-7. 1993.

FONSECA, S. G.; FERREIRA, A. M.; DINIZ, C. R. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with scorpion toxins detoxified by liposomal entrapment. Braz J Med Biol Res, v.30, n.7, Jul, p.883-6. 1997.

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

FREIRE-MAIA, L. e CAMPOS, J. A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: (Ed.). Natural toxins. Oxford: Pergamon Press, 1989. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning, p.139-159

FREIRE-MAIA, L.; PINTO, G. I. e FRANCO, I. Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. J Pharmacol Exp Ther, v.188, n.1, Jan, p.207-13. 1974.

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

FUNED. Fundação Ezequiel Dias: Soro Anti-Escorpiônico - Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/produtos_servicos/imunobiologicos/bulas/Bula_Soro_Antiescorpionico_ver.04.pdf>. Acesso em: agosto de 2007.

GALLUCCIO, M.; BRIZIO, C.; TORCHETTI, E. M.; FERRANTI, P.; GIANAZZA, E.; INDIVERI, C. e BARILE, M. Over-expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of isoform 2 of human FAD synthetase. Protein Expr Purif, v.52, n.1, Mar, p.175-81. 2007.

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

GAZARIAN, K. G.; GAZARIAN, T.; HERNANDEZ, R. e POSSANI, L. D. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. Vaccine, v.23, n.26, May 16, p.3357-68. 2005.

GAZARIAN, T.; SELISKO, B.; HERION, P. e 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, v.37, n.12-13, Aug-Sep, p.755-66. 2000.

GAZARIAN, T. G.; SELISKO, B.; GURROLA, G. B.; HERNANDEZ, R.; POSSANI, L. D. e GAZARIAN, K. G. Potential of peptides selected from random phage-displayed libraries to mimic conformational epitopes: a study on scorpion toxin Cn2 and the neutralizing monoclonal antibody BCF2. Comb Chem High Throughput Screen, v.6, n.2, Mar, p.119-32. 2003.

GIGOVA, L.; WISHART, P.; USCHEVA, A.; IVANOVA, M.; BARDAROV, S.; JAY, E. e IVANOV, I. Expression of repetitive human calcitonin genes in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem, v.11, n.4, Aug, p.401-12. 1989.

GO. Gene Ontology: Disponível em: <<http://www.geneontology.org>>. Acesso em: agosto e setembro de 2007.

GOA. Gene Ontology Annotation - EBI: Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/GOA>>. Acesso em: agosto e setembro de 2007.

GOMEZ, M. V. Purificação e caracterização da toxina do escorpião *Tityus serrulatus*. Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, 1967.

GOMEZ, M. V.; DAI, M. E. e DINIZ, C. R. Effect of scorpion venom, tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. J Neurochem, v.20, n.4, Apr, p.1051-61. 1973.

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

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

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

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

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

GRANIER, C.; NOVOTNY, J.; FONTECILLA-CAMPS, J. C.; FOURQUET, P.; EL AYEB, M. e BAHRAOUI, E. The antigenic structure of a scorpion toxin. Mol Immunol, v.26, n.6, Jun, p.503-13. 1989.

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.; PRADO, V. F.; DINIZ, C. R.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. e KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, v.37, n.3, Mar, p.507-17. 1999.

GUATIMOSIM, S. C.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C. R. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. Toxicon, v.38, n.1, Jan, p.113-21. 2000.

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

HARLOW, E. e LANE, D. Antibodies. In: C. S. H. Laboratory (Ed.). A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor, 1988. Antibodies

HASSAN, F. Production of Scorpion Antivenin. In: A. T. Tu (Ed.). Handbook of Natural Toxins. New York: Marcel Dekker, INC., v.2, 1984. Production of Scorpion Antivenin, p.577-605

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

HERION, P.; GURROLA-BRIONES, G.; DEL ROCIO SANCHEZ, M.; SAAVEDRA, R. e POSSANI, L. D. Monoclonal antibodies against noxiustoxin. Hybridoma, v.14, n.3, Jun, p.247-51. 1995.

HERNANDEZ, R.; GAZARIAN, T. G.; HERION, P. S. e 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. Immunol Lett, v.80, n.2, Feb 1, p.97-103. 2002.

HOLADAY, S. K., JR.; MARTIN, B. M.; FLETCHER, P. L., JR. e KRISHNA, N. R. NMR solution structure of butantoxin. Arch Biochem Biophys, v.379, n.1, Jul 1, p.18-27. 2000.

ISHIKAWA, H. e TAMAOKI, H. Production of human calcitonin in *Escherichia coli* from multimeric fusion protein. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.82, n.2, p.140-144. 1996.

INCEOGLU, B.; LANGO, J.; WU, J.; HAWKINS, P.; SOUTHERN, J. e HAMMOCK, B. D. Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). Eur J Biochem, v.268, n.20, Oct, p.5407-13. 2001.

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

JI, Y. H.; HUANG, H. Y.; ZHOU, C. W.; HOSHINO, M.; MOCHIZUKI, T. e YANAIHARA, N. BmK AS, an active scorpion polypeptide, enhancer [3H]-noradrenaline release from rat hippocampal slices. Biochem. Res., v.18, p.257-260. 1997.

JI, Y. H.; LI, Y. J.; ZHANG, J. W.; SONG, B. L.; YAMAKI, T.; MOCHIZUKI, T.; HOSHINO, M. e YANAIHARA, N. Covalent structures of BmK AS and BmK AS-1, two novel bioactive polypeptides purified from Chinese scorpion *Buthus martensi Karsch*. Toxicon, v.37, n.3, Mar, p.519-36. 1999.

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

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L. e HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). Gene, v.299, n.1-2, Oct 16, p.279-91. 2002.

KALAPOTHAKIS, E. e CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. Toxicon, v.35, n.10, Oct, p.1523-9. 1997.

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

KHARRAT, R.; ZENOUBAKI, I.; BEN LASFAR, Z.; MILED, K. e EL AYEB, M. Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. Toxicon, v.35, n.6, Jun, p.915-30. 1997.

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

KIRUBAKARAN, S. I. e SAKTHIVEL, N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, v.52, n.1, Mar, p.159-66. 2007.

KOBAYASHI, Y.; TAKASHIMA, H.; TAMAOKI, H.; KYOGOKU, Y.; LAMBERT, P.; KURODA, H.; CHINO, N.; WATANABE, T. X.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S. e ET AL. The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. Biopolymers, v.31, n.10, Sep, p.1213-20. 1991.

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

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

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

KOZLOV, S.; MALYAVKA, A.; MCCUTCHEN, B.; LU, A.; SCHEPERS, E.; HERRMANN, R. e GRISHIN, E. A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom. Proteins, v.59, n.1, Apr 1, p.131-40. 2005.

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

LARABA-DJEBARI, F.; LEGROS, C.; CREST, M.; CEARD, B.; ROMI, R.; MANSUELLE, P.; JACQUET, G.; VAN RIETSCHOTEN, J.; GOLLA, M.; ROCHAT, H. e ET AL. The kalitoxin family enlarged. Purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis* venom. J Biol Chem, v.269, n.52, Dec 30, p.32835-43. 1994.

LECOMTE, C.; FERRAT, G.; FAJLOUN, Z.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; DARBON, H. e SABATIER, J. M. Chemical synthesis and structure-activity relationships of Ts kappa, a novel scorpion toxin acting on apamin-sensitive SK channel. J Pept Res, v.54, n.5, Nov, p.369-76. 1999.

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

LEGROS, C.; CEARD, B.; BOUGIS, P. E. e MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. FEBS Lett, v.431, n.3, Jul 24, p.375-80. 1998.

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

LIU, X. Q.; YANG, X. Q.; XIE, F. H.; SONG, L. Y.; ZHANG, G. Q. e QIAN, S. J. On-column refolding and purification of transglutaminase from *Streptomyces fradiae* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, v.51, n.2, Feb, p.179-86. 2007.

LOMBET, A. e LAZDUNSKI, M. Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using Tityus toxin gamma. Eur J Biochem, v.141, n.3, Jun 15, p.651-60. 1984.

LOPEZ-GONZALEZ, I.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; DE LA VEGA-BELTRAN, J. L.; VAN DER WALT, J.; DYASON, K.; POSSANI, L. D.; FELIX, R. e DARSZON, A. Scorpion toxins that block T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. Biochem Biophys Res Commun, v.300, n.2, Jan 10, p.408-14. 2003.

LORET, E. P.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; MANSUELLE, P.; SAMPIERI, F.; GRANIER, C. e ROCHAT, H. An anti-insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis Hector* also acts on the alpha- and beta-sites of the mammalian sodium channel: sequence and circular dichroism study. Biochemistry, v.30, n.3, Jan 22, p.633-40. 1991.

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

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

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

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

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

MAGALHAES, G. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; LOPES-FERREIRA, M.; LORENZINI, D. M.; HO, P. L. e MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. Biochimie, v.88, n.6, Jun, p.693-9. 2006.

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

MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DE LIMA, M. E.; ROCHAT, H. e 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, v.1, n.2, p.119-25. 1992.

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

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

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

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; BECHIS, G.; EL AYEB, M.; SAMPIERI, F.; BRANDO, T.; DINIZ, C. R. e ROCHAT, H. Purification and characterization of eight toxins from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. Toxicon, v.23, p.594. 1985.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H. e BOUGIS, P. E. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS Lett, v.302, n.3, May 18, p.220-2. 1992.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; CEARD, B.; RIBEIRO, A. M.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H. e BOUGIS, P. E. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS Lett, v.342, n.2, Apr 4, p.181-4. 1994.

MAURANO, H. R. Do Escorpionismo. Rio de Janeiro, 1915.

MEDYNSKI, D.; TUAN, M.; LIU, W.; WU, S. e LIN, X. Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies. Protein Expr Purif, v.52, n.2, Apr, p.395-402. 2007.

MEKI, A. R.; NASSAR, A. Y. e ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. Peptides, v.16, n.8, p.1359-65. 1995.

MENDES, T. M.; MARIA, W. S.; GRANIER, C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. e KALAPOTHAKIS, E. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. Toxicon, v.44, n.6, Nov, p.617-24. 2004.

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

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

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

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; THEVISSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J. e VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. Eur J Biochem, v.269, n.19, Oct, p.4799-810. 2002.

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

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

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

MOUSLI, M.; DEVAUX, C.; ROCHAT, H.; GOYFFON, M. e BILLIALD, P. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. FEBS Lett, v.442, n.2-3, Jan 15, p.183-8. 1999.

MUDADO, M. A. Uso da base de dados secundária KOG como ferramenta para caracterização de expressão gênica e mineração de dados em projetos transcriptomas. Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, 2007. 134 p.

NCBI. National Center for Biotechnology: Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: janeiro de 2005 e setembro de 2007.

NIRTHANAN, S.; PIL, J.; ABDEL-MOTTALEB, Y.; SUGAHARA, Y.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; JOSEPH, J. S.; SATO, K. e TYTGAT, J. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. Biochem Pharmacol, v.69, n.4, Feb 15, p.669-78. 2005.

NORTON, R. S. e PALLAGHY, P. K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. Toxicon, v.36, n.11, Nov, p.1573-83. 1998.

NOVAES, G.; CATANZARO, O. L.; BERALDO, W. T. e FREIRE-MAIA, L. Effect of purified scorpion toxin (tityustoxin) on the pancreatic secretion of the rat. Toxicon, v.20, n.5, p.847-53. 1982.

NOVAGEN, Ed. pET System Manual: the gold standard for protein expressed. 2005.

NOVELLO, J. C.; ARANTES, E. C.; VARANDA, W. A.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. e MARANGONI, S. TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels. Toxicon, v.37, n.4, Apr, p.651-60. 1999.

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

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

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

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

PAURON, D.; BARHANIN, J. e LAZDUNSKI, M. The voltage-dependent Na⁺ channel of insect nervous system identified by receptor sites for tetrodotoxin, and scorpion and sea anemone toxins. Biochem Biophys Res Commun, v.131, n.3, Sep 30, p.1226-33. 1985.

PHRAP. PHRagment Assembly Program: Disponível em: <<http://www.phrap.org>>. Acesso em: agosto e setembro de 2007.

PI, C.; LIU, J.; PENG, C.; LIU, Y.; JIANG, X.; ZHAO, Y.; TANG, S.; WANG, L.; DONG, M.; CHEN, S. e XU, A. Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. Genomics, v.88, n.6, Dec, p.809-19. 2006.

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

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

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

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

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

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

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

RAMIREZ-DOMINGUEZ, M. E.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GARCIA, U.; GARCIA, C.; ARECHIGA, H. e POSSANI, L. D. Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true blocker of Na(+) currents in crayfish neurons. J Exp Biol, v.205, n.Pt 6, Mar, p.869-76. 2002.

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

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FACA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O. e FRANCA, S. C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. Protein Expr Purif, v.37, n.1, Sep, p.102-8. 2004.

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

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

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

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

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Col Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 2 e 3. 1989

SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; PRADO, W. A.; RICCIOPPO NETO, F. e GIGLIO, J. R. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon, v.29, n.6, p.663-72. 1991.

SAMPAIO, S. V.; COUTINHO-NETTO, J.; ARANTES, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C. e GIGLIO, J. R. TsTX-VII, a new toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom able to induce the release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes not blocked by tetrodotoxin. Biochem Mol Biol Int, v.41, n.6, May, p.1255-63. 1997.

SAMPAIO, S. V.; LAURE, C. J. e GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. Toxicon, v.21, n.2, p.265-77. 1983.

SANTANA, G. C.; FREIRE, A. C.; FERREIRA, A. P.; CHAVES-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R. e FREIRE-MAIA, L. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. Toxicon, v.34, n.9, Sep, p.1063-6. 1996.

SCHWARTZ, E. F.; DIEGO-GARCIA, E.; RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. e POSSANI, L. D. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). BMC Genomics, v.8, p.119. 2007.

SELISKO, B.; COSIO, G.; GARCIA, C.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. e 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 hoffmann*. Toxicon, v.43, n.1, Jan, p.43-51. 2004.

SIDACH, S. S. e MINTZ, I. M. Kurtxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. J Neurosci, v.22, n.6, Mar 15, p.2023-34. 2002.

SILVESTRE, F. G. Caracterização parcial bioquímica, imunológica e molecular do veneno das aranhas *Loxoceles similis*, *L. gaucho*, *L. anomala* e *Lasiodora* sp. Departamento de Farmacologia, UFMG, Belo Horizonte, 2005. 183 p.

SISSOM, W. D. Systematics, biogeography and paleontology. In: G. A. Pous (Ed.). The Biology of Scorpion. Stanford: Stanford University Press, 1990. Systematics, biogeography and paleontology, p.64-160

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

SORENSEN, H. P. e MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol, v.115, n.2, Jan 26, p.113-28. 2005b.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L. e ALONSO, C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol, v.36, n.1, Jan, p.58-63. 1998.

SRAIRI-ABID, N.; GUIJARRO, J. I.; BENKHALIFA, R.; MANTEGAZZA, M.; CHEIKH, A.; BEN AISSA, M.; HAUMONT, P. Y.; DELEPIERRE, M. e EL AYEB, M. A new type of scorpion Na⁺-channel-toxin-like polypeptide active on K⁺ channels. Biochem J, v.388, n.Pt 2, Jun 1, p.455-64. 2005.

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

TAN, Z. Y.; MAO, X.; XIAO, H.; ZHAO, Z. Q. e JI, Y. H. *Buthus martensi* Karsch agonist of skeletal-muscle RyR-1, a scorpion active polypeptide: antinociceptive effect on rat peripheral nervous system and spinal cord, and inhibition of voltage-gated Na(+) currents in dorsal root ganglion neurons. Neurosci Lett, v.297, n.2, Jan 12, p.65-8. 2001.

TAUTZ, D. e RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. Anal Biochem, v.132, n.1, Jul 1, p.14-9. 1983.

THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. e GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon, v.41, n.5, Apr, p.541-57. 2003.

TOLEDO, D. e NEVES, A. G. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. Comp Biochem Physiol B, v.55, n.2, p.249-53. 1976.

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

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

TURKOV, M.; RASHI, S.; NOAM, Z.; GORDON, D.; BEN KHALIFA, R.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. e GUREVITZ, M. In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, v.10, n.1, Jun, p.123-31. 1997.

TYTGAT, J.; CHANDY, K. G.; GARCIA, M. L.; GUTMAN, G. A.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F.; VAN DER WALT, J. J. e POSSANI, L. D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. Trends Pharmacol Sci, v.20, n.11, Nov, p.444-7. 1999.

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

UNIPROT. UniProt - The Universal Protein Resource: Disponível em: <<http://www.pir.uniprot.org>>. Acesso em: agosto e setembro de 2007.

VALDEZ-CRUZ, N. A.; BATISTA, C. V.; ZAMUDIO, F. Z.; BOSMANS, F.; TYTGAT, J. e POSSANI, L. D. Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. Eur J Biochem, v.271, n.23-24, Dec, p.4753-61. 2004.

VALDEZ-CRUZ, N. A.; SEGOVIA, L.; CORONA, M. e POSSANI, L. D. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. Gene, v.396, n.1, Jul 1, p.149-58. 2007.

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

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

VERDONCK, F.; BOSTEELS, S.; DESMET, J.; MOERMAN, L.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; TYTGAT, J. e VAN DER WALT, J. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). Cimbebasia, v.16, p.247-260. 2000.

VIJVERBERG, H. P.; PAURON, D. e LAZDUNSKI, M. The effect of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on Na channels in neuroblastoma cells. Pflugers Arch, v.401, n.3, Jul, p.297-303. 1984.

VILELA, E. Soroterapia anti-escorpiônica. Brasil Médico, v.Ano XXXI, n.46. 1917.

VILLAVERDE, A. e CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. Biotechnol Lett, v.25, n.17, Sep, p.1385-95. 2003.

VIULLARD, L. e FREEMAN, A. Molecular Biology Protocols: Preparation of active proteins from inclusion bodies. University de St. Andrews U. K.: Disponível em:

<<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.nwfsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>>. Acesso em: junho de 2006.

VITAL-BRAZIL, G. Soro anti-escorpiônico. Mem Inst Butantan, v.1, n.1, p.47-52. 1919.

WAGSTAFF, S. C. e HARRISON, R. A. Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocellatus*, reveals novel alpha9beta1 integrin-binding motifs in venom metalloproteinases and a new group of putative toxins, renin-like aspartic proteases. Gene, v.377, Aug 1, p.21-32. 2006.

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

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

WARNER, L. R.; BLASICK, C. M.; BROWN, R. J. e OXFORD, J. T. Expression, purification, and refolding of recombinant collagen alpha1(XI) amino terminal domain splice variants. Protein Expr Purif, v.52, n.2, Apr, p.403-9. 2007.

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

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

WERKMAN, T. R.; GUSTAFSON, T. A.; ROGOWSKI, R. S.; BLAUSTEIN, M. P. e ROGAWSKI, M. A. Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1.2 K⁺ channel. Mol Pharmacol, v.44, n.2, Aug, p.430-6. 1993.

WIKIPEDIA. A Enciclopédia Livre: Canais HERG. Disponível em: <<http://www.wikipedia.org/wiki/HERG>>. Acesso em: agosto de 2007.

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

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

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

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

YANG, J.; ZHANG, W.; LIU, K.; JING, S.; GUO, G.; LUO, P. e ZOU, Q. Expression, purification, and characterization of recombinant human interleukin 24 in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, v.53, n.2, Jun, p.339-45. 2007.

YAO, J.; CHEN, X.; LI, H.; ZHOU, Y.; YAO, L.; WU, G.; CHEN, X.; ZHANG, N.; ZHOU, Z.; XU, T.; WU, H. e DING, J. BmP09, a "long chain" scorpion peptide blocker of BK channels. J Biol Chem, v.280, n.15, Apr 15, p.14819-28. 2005.

YATANI, A.; KIRSCH, G. E.; POSSANI, L. D. e BROWN, A. M. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. Am J Physiol, v.254, n.3 Pt 2, Mar, p.H443-51. 1988.

ZAMUDIO, F.; SAAVEDRA, R.; MARTIN, B. M.; GURROLA-BRIONES, G.; HERION, P. e POSSANI, L. D. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Eur J Biochem, v.204, n.1, Feb 15, p.281-92. 1992.

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

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

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

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

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

ZENOUEKI, I.; KHARRAT, R.; SABATIER, J. M.; DEVAUX, C.; KAROUI, H.; VAN RIETSCHOTEN, J.; EL AYEB, M. e ROCHAT, H. In vivo protection against *Androctonus australis* hector scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. Vaccine, v.15, n.2, Feb, p.187-94. 1997.

ZHANG, B.; LIU, Q.; YIN, W.; ZHANG, X.; HUANG, Y.; LUO, Y.; QIU, P.; SU, X.; YU, J.; HU, S. e YAN, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. BMC Genomics, v.7, p.152. 2006.

ZHAO, D. X.; DING, Z. C.; LIU, Y. Q. e HUANG, Z. X. Overexpression and purification of single zinc finger peptides of human zinc finger protein ZNF191. Protein Expr Purif, v.53, n.1, May, p.232-7. 2007.

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

ZHU, S.; DARBON, H.; DYASON, K.; VERDONCK, F. e TYTGAT, J. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. Faseb J, v.17, n.12, Sep, p.1765-7. 2003.

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

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