

## RESUMO

Esta tese trata de um estudo imunológico das toxinas escorpionicas. Quatro artigos foram apresentados dentro desse tema. No primeiro, um imunógeno detoxificado foi preparado. Para isso, a fração tóxica do veneno de *Tityus serrulatus* (TstFG<sub>50</sub>) foi conjugada a albumina bovina (BSA) com glutaraldeído e injetados em camundongos, para obtenção de anticorpos. Ensaios de proteção *In vivo* mostraram que os camundongos vacinados resistiram ao desafio de duas DL.50 da TstFG<sub>50</sub>. Nós usamos o método de SPOT para caracterizar os epitopos dos anticorpos protetores. Acredita-se os epitopos encontrados correspondam a regiões das toxinas que são conhecidas por estarem envolvidas com o sítio ativo.

No segundo artigo, anticorpos monoclonais (mAbs) contra o veneno de *Tityus serrulatus* foram produzidos e caracterizados. A capacidade neutralizante dos anticorpos frente a TstFG<sub>50</sub> foi determinada em ensaios de neutralização *in vitro*. O mAbTsl foi capaz de neutralizar 50% dos efeitos tóxicos produzidos pelo veneno do escorpião e mostrou uma inibição de 35% da ligação de TsVII- I<sup>125</sup> a sinaptossomas. Para mapear os epitopos reconhecidos pelo mAbTsl, nós usamos o método de SPOT. As propriedades neutralizantes do mAbTsl poderiam ser explicadas pela localização espacial do epitopo reconhecido, que apresenta resíduos próximos aos resíduos que compõe o farmacoporo das toxinas.

Num outro artigo, a técnica de SPOT foi utilizada para caracterizar a ligação dos peptídeos da TsII, TsIV e TsVII com os soros de cavalo anti-Ts de uso terapêutico. Todos anti-soros testados mostraram reatividade com os peptídeos das três toxinas. Os peptídeos reativos foram sintetizados, acoplados a KLH e usados como antígenos em microplacas de ELISA. A mistura dos peptídeos indicou uma relação linear entre título e potencial neutralizante para os soros de baixa potência. No entanto, o mesmo não foi visto para os soros de alta potência. Esta observação é discutida no contexto de que as toxinas apresentem epitopos contínuos e descontínuos.

No último trabalho foi feito um estudo imunológico de uma proteína atóxica, a Amm VIII. Esta proteína foi previamente isolada do veneno do escorpião *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. Ela apresenta 87% de identidade com a AaH II, uma potente  $\alpha$ -toxina, e mesmo assim não é tóxica para camundongos. No entanto, anticorpos contra essa toxina foram capazes de proteger camundongos do efeito letal da AaH II. Aqui, nós mostramos que Amm VIII induz anticorpos que reconhecem somente epitopos do tipo descontínuos. Análises da localização 3D dos segmentos peptídicos descontínuos-contínuos antigenicamente ativos destaca propriedades antigênicas da anatoxina Amm VIII e explica de maneira razoável a capacidade dos anticorpos anti-AmmVIII neutralizarem uma potente  $\alpha$ -toxina, a AaH II.

## ABSTRACT

The major goal of this thesis is the immunochemical study of the scorpion toxins. Four manuscripts were presented concerning this subject. In the first report, a detoxified immunogen was prepared by conjugation of a toxic fraction (TstFG<sub>50</sub>), of the *T. serrulatus* venom, with bovine serum albumin (BSA). The immunogen was injected in mice for inducing antibodies. In vivo protection assays showed that immunized mice resist to the challenge with a dose of twice LD<sub>50</sub> of the TstFG<sub>50</sub>. We used the Spot method to characterize epitopes of protective antibodies. It is likely that these epitopes correspond to the neutralizing epitopes. Usually, they correspond to regions of the toxins that are known to be involved in the toxin active sites.

In the second manuscript, monoclonal antibodies (mAbs) against *Tityus serrulatus* venom were produced and characterized. The capacity of mAbs to neutralize the TstFG<sub>50</sub> was determined by in vitro neutralization assays. Only mAbTsl neutralized 50% of the toxic effects produced by scorpion venom and showed 35% inhibition of the binding of <sup>125</sup>I-TsVII. To map the epitope recognized by the protective mAbTsl, the Spot method was used. The neutralizing properties of mAbTs1 might be explained by spatial vicinity of epitope residues with pharmacophore residues.

In the following paper, the Spot method was used to characterize the binding of the peptides of the TsII, TsIV and TsVII with horse anti-Ts antisera for therapeutic use. All antisera tested showed reactivity with several peptides from all three toxins. The reactive peptides were synthesized, coupled to KLH and used as antigens to coat the microtitration by ELISA. The mixture of the N-terminal peptides of TsII, and TsVII and of the C-terminal of TsIV were found to give a linear relationship with the neutralizing titer of horse's serum of low neutralizing potency. However, high neutralizing antivenoms did not show the expected response in peptide ELISA. This observation is discussed in the context of the occurrence of continuous and discontinuous epitopes at the toxins.

Finally, in the last paper we conducted an immunochemical study of the anatoxin Amm VIII. This protein was previously isolated from the venom of the scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. Despite 87% identity with AaH II, potent  $\alpha$ -toxin, Amm VIII is not toxic to mice. However, antisera against this protein protect mice from AaH II lethal action. Here, we report that the Amm VIII protein elicits only antibodies that recognize discontinuous-type epitopes. Anti-Amm VIII antibodies were also found to cross-react towards several of the discontinuous-continuous peptides designed from the AaH II structure, pointing to a possible involvement of the corresponding discontinuous epitopes in the in vitro AaH II neutralizing capacity displayed by anti-Amm VIII antibodies. Altogether, our results show that it is possible to design antibody-reactive peptides from discontinuous parts of scorpion toxins. The position of the reactive segments in the structural context of scorpion toxins highlights the antigenic properties of the Amm VIII anatoxin and reasonably explains the capacity of anti-Amm VIII antibodies to neutralize the potent  $\alpha$  scorpion toxin AaH II.

