

Dissertação de Mestrado

CELIANA MARIA FERRARINI TRICHES

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM EPITOPO
CONFORMACIONAL DA BETA-NEUROTOXINA TS1 DO
ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

CELIANA MARIA FERRARINI TRICHES

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM EPITOPO
CONFORMACIONAL DA BETA-NEUROTOXINA TS1 DO
ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense – UNESC,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências de Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez
Machado de Ávila.

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T823p Triches, Celiana Maria Ferrarini.
Predição e caracterização de um epitopo conformacional da
beta-neurotoxina TSI do escorpião *Tityus serrulatas* / Celina
Maria Ferrarini Triches. – 2017.

83p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Escorpião – Veneno. 2. Escorpionismo. 3. Neurotoxina.
I. Título.

CDD. 22ª ed. 615.942



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata **Celiana Maria Ferrarini Triches** sob o título “**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM EPITOPO CONFORMACIONAL DA BETA-NEUROTOXINA TSI DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***”, para obtenção do grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Criciúma, SC, 30 de junho de 2017.

Prof. Dr. PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA
Membro Relator

Prof.ª Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Interno

Prof.ª Dra. STEPHANIE STRANSKY LÁUAR
Membro Externo – UFMG

Prof. Dr. Ricardo Andréz Machado de Ávila
Orientador

Prof.ª Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação de mestrado foi elaborada seguindo a Resolução N. 08/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LABIM, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Este trabalho foi financiado por meio de fomento do CNPq N. 455161/2014-3 e da FAPESC/2016TR2239.

AGRADECIMENTOS

Palavras me faltam para agradecer a todos que tanto me auxiliaram para que este projeto fosse concluído. Aliás mais que um projeto, um sonho, pois nós professores sonhamos em tornar mestre, sempre visando adquirir mais conhecimento e contribuir para a formação de nossos alunos. Já que palavras me faltam, irei recorrer a diversas fontes para mostrar o quanto sou grata por todos terem contribuído para a realização de um sonho.

De início, tenho que agradecer a toda minha família, pela paciência e colaboração, sem a força de meu esposo e filhos, com certeza, não teria conseguido chegar até aqui: “e que o coração nunca se perca em meio a ansiedade da vida. Que saiba persistir com sabedoria, que neste caminhar encontre somente aqueles que o façam forte, e que o queiram feliz”, muito obrigada, família.

Em especial, quero agradecer aos meus filhos Guilherme Triches e Vinícius Triches, sem o esforço e dedicação em me auxiliar, não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada! “Ser mãe é deixar para trás uma vida organizada e previsível por uma vida repleta de surpresas e aventuras”, vocês são a maior aventura de minha vida, se pudesse escolher, faria as mesmas escolhas para terem vocês comigo sempre.

“Abençoados sejam os irmãos que a vida deixa escolher”, com esta simples frase, quero agradecer a Marcia Pereira e Rahisa Scussel, pela dedicação e esforço para a realização deste projeto.

Porém, tenho que ressaltar a dedicação da Mírian Ivens Fagundes, pela sua competência e paciência, sempre atenta para solucionar todas as dúvidas e auxiliar neste projeto, com certeza, não teria concluído sem sua ajuda, muito obrigada. “Gratidão vai além de ‘muito obrigada’, ultrapassa gentilezas e é superior a qualquer interesse... Gratidão é virtude de quem reconhece em Deus e no outro o valor que ele tem e o que ele faz sem exigir nada em troca... Quem sabe agradecer está apto a crescer”. Muito obrigada, você foi fundamental neste momento de minha vida. Sou grata por tudo.

Muito obrigada é pouco para agradecer a dedicação do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, na sua infinitude de sabedoria e paciência, soube indicar o caminho a ser seguido, com uma simples frase que eu possa expressar a minha satisfação de tê-lo como orientador: “Quem compartilha o que sabe, muda a história de quem aprende”, a minha história mudou, assim, não tendo outra forma de

agradecer, digo muito obrigada e desejo que você continue mudando a história de muitos discípulos.

RESUMO

No mundo ocorrem muitos acidentes com animais peçonhentos e, entre eles, destacam-se os causados pelos escorpiões, que são considerados um problema de saúde pública. No Brasil, esses acidentes estão classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doenças negligencias. O principal escorpião responsável pelos acidentes no país, e também o mais perigoso é o *Tityus serrulatus*, popularmente chamado de escorpião amarelo. A picada deste animal é uma ameaça grave ao indivíduo acidentado, já que seu veneno é composto por toxinas potentes que podem levá-lo à morte em poucas horas. Entre as toxinas do veneno, a mais tóxica e que corresponde a 15% do peso do veneno é chamada de Ts1. A Ts1 é classificada como β -neurotoxina que atua em canais de Na^+ . Por ser considerada a principal toxina da peçonha e exercer uma importância representativa no processo de envenenamento, neutralizá-la significaria uma possível neutralização da atividade tóxica do veneno. Desta forma, este estudo teve como objetivo identificar um epítipo conformacional da Ts1. Este epítipo foi sintetizado quimicamente e utilizado como antígeno na produção de um soro capaz de neutralizar a toxina e o veneno total. Para isso, foram utilizadas ferramentas de bioinformática utilizando os softwares *Sting Millenium*, *Java Protein Dossier* e *SwissPDBviewer*, síntese de peptídeos utilizando a técnica Fmoc-Sínteses, imunizações e soroneutralização em camundongos adultos. Os resultados de ELISA e de neutralização *in vivo* mostraram que o epítipo conformacional predito foi capaz de produzir anticorpos que reconhecem o veneno e neutralizam o seu efeito tóxico. Concluiu-se que a produção deste anticorpo, a partir do epítipo sintetizado, pode se tornar uma alternativa para a produção atual de antivenenos, além de atender a condições expostas em debates em torno da bioética.

Palavras-chave: Anticorpos, Bioinformática, Epítopos conformacionais, *Tityus serrulatus*, Ts1, veneno.

ABSTRACT

Accidents with venomous animals, including scorpions, are considered a public health problem across the world. In Brazil, these accidents are classified by the Ministry of Health as neglected diseases. The main scorpion specie responsible for the accidents in the country and also the most dangerous is the *Tityus serrulatus*, popularly known as yellow scorpion. The sting of this animal is a serious threat to its victim, since its venom is composed of potent toxins that can lead to death in a few hours. Among the toxins of the venom, the most toxic and the one which corresponds to 50% of its weight is called Ts1. Ts1 is classified as β -neurotoxin that acts on Na⁺ channels. Because it is considered the main toxin of the venom and exerts a representative importance in the poisoning process, neutralizing it would mean neutralizing the toxic activity of the venom. For this reason, this study aimed to identify a conformational epitope of Ts1. This epitope has been chemically synthesized and used as antigen in the production of an antivenom capable of neutralizing the toxin and venom. For this, we used bioinformatics tools, peptide synthesis, and immunizations in adult mice. ELISA and in vivo neutralization results showed that the predicted conformational epitope was capable of producing antibodies that recognize the venom and neutralize its toxic effect. It was concluded that the production of this antibody from the epitope synthesized, maybe can be an alternative for the current production of antivenoms, in addition to attend conditions exposed in debates around bioethics.

Keywords: Antibodies, Bioinformatics, Conformational epitopes, *Tityus serrulatus*; Antibodies, Ts1, poison.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Morfologia do escorpião..... | 27 |
| Figura 2 - Principais espécies de escorpiões responsáveis pelos acidentes no Brasil. | 29 |
| Figura 3 - Estrutura de um canal para sódio..... | 36 |
| Figura 4 - Estrutura tridimensional da toxina Ts1 de <i>Tityus serrulatus</i> (PDB: 1NPI)..... | 37 |
| Figura 5 - Fluxograma de atendimento de acidente escorpiônico..... | 39 |
| Figura 6 - Estrutura geral de uma imunoglobulina..... | 42 |
| Figura 7 - Distribuição dos determinantes antigênicos (epítomos) sequenciais (lineares) e não sequenciais (conformacionais) em uma molécula proteica. | 44 |
| Figura 8 - Representação esquemática dos diferentes tipos de epítomos. | 44 |
| Figura 9 - Informações da Ts1 depositada sob o código 1NPI no banco de dados <i>Protein Data Bank</i> | 53 |
| Figura 10 - Resultados da seleção dos resíduos de aminoácidos mais acessíveis na Ts1..... | 54 |
| Figura 11 - Epítomo conformacional predito na Ts1. | 55 |
| Figura 12 - ELISA Indireta da reatividade do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> | 56 |
| Figura 13 - ELISA Indireta da reatividade do peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Número de óbitos ocasionados por escorpíões no Brasil de acordo com a faixa etária. | 30 |
| Tabela 2 - Manifestações clínicas mais frequentes em acidentes escorpiônicos | 40 |
| Tabela 3 – Resultados da Neutralização <i>in vivo</i> | 58 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

| | |
|----------|--|
| Ac | Anticorpo |
| ADAM's | Desintegrina e Metaloprotease (do inglês: <i>A Desintegrin and Metalloprotease</i>) |
| Ag | Antígeno |
| Ag-Ac | Complexo Antígeno – anticorpo |
| Anti-BSA | Anti-soro albumina bovino, do inglês: <i>bovine albumin sérum</i> |
| BCR | Receptor de células B (do inglês: <i>B-cell receptor</i>) |
| BSA | Albumina do soro bovino (do inglês: <i>bovine albumin sérum</i>) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>) |
| DMF | Dimetilformamida |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i>) |
| Fmoc | Fluorenil-metil-oxicarbonila |
| Ig | Imunoglobulina |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgD | Imunoglobulina D |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| MHC | Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês: <i>Major histocompatibility complex</i>) |
| Nm | Nanômetro |

| | |
|-------|--|
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPD | Ortofenildiamina |
| PDB | Banco de dados de proteínas, do inglês: <i>Protein Data Bank</i> |
| PI | Pré-imune |
| RNA | Ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>) |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravo de Notificações |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 26 |
| 1.1 ESCORPIÃO..... | 26 |
| 1.1.1 Gênero Tityus | 28 |
| 1.1.2 Escorpionismo | 29 |
| 1.1.3 Envenenamento | 31 |
| 1.2 VENENOS | 31 |
| 1.2.1 Neurotoxinas escorpiônicas | 33 |
| 1.2.2 Ts1 | 36 |
| 1.2.3 Sintomatologia | 38 |
| 1.2.4 Tratamento | 39 |
| 1.3 ANTÍGENO E ANTICORPO | 41 |
| 1.3.1 Epítomos | 42 |
| 1.3.2 Mapeamento de epítopo | 45 |
| 2 OBJETIVOS | 47 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 47 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 47 |
| 3 METODOLOGIA | 48 |
| 3.1 PREDIÇÃO DE EPÍTOPO CONFORMACIONAL..... | 48 |
| 3.2 DESENHO DE UM PEPTÍDEO <i>in silico</i> | 48 |
| 3.3 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS | 48 |
| 3.4 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS | 50 |
| 3.4.1 Imunização e obtenção dos soros | 50 |
| 3.4.2 Ensaio de ELISA | 51 |
| 3.4.3 Ensaio de neutralização <i>in vivo</i> | 52 |
| 4 RESULTADOS | 53 |
| 5 DISCUSSÃO | 58 |

| | |
|---|-----------|
| 6 CONCLUSÃO | 69 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |
| ANEXO | 83 |
| ANEXO A – CERTIFICADO CEUA..... | 84 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESCORPIÃO

Os escorpiões habitam o planeta há mais de 400 milhões de anos, estando na lista dos primeiros artrópodes a dominar o ambiente terrestre (Lourenço, 2003). Atualmente, são localizados em savanas, florestas tropicais, regiões litorâneas, desertos, cavernas, isto significa que se encontram extensamente distribuídos em todo o planeta, com exceção da Antártica (Komposch, 2010). Além disso, esses animais podem ser encontrados em ambientes alterados pelo homem. Possuem hábitos normalmente noturnos, mas, durante o dia, são localizados em cascas de árvores, troncos, pedras e em esgotos, sendo que esse último favorece a sua intrusão em residências e, até mesmo, em grandes edifícios (Miranda, 2008).

A fase gestacional dos escorpiões ocorre em um espaço de tempo que compreende 3 a 6 meses e podem surgir oscilações na quantidade de filhotes. O escorpião *Tityus serrulatus*, por exemplo, tem, em média, 10 filhotes. No entanto, algumas outras espécies podem ter até 90 filhotes por gestação facilitando sua disseminação e aumentando assim o risco de acidentes com humanos. Estima-se que no mundo, anualmente, ocorram mais de 1.500.000 casos de acidentes com escorpiões, levando a, em média 2.600 casos de óbito (Lourenço; Cuellar, 1995)

Esses animais são artrópodes, pertencendo à classe dos aracnídeos e na ordem dos Scorpiones. Estão distribuídos em 19 famílias constituídas por centenas de gêneros, que perfazem mais de 1900 espécies já catalogadas (Prendini; Wheeler, 2005; Chippaux, 2012). Somente 25% dessas espécies são conhecidas como protagonistas de acidentes considerados graves, podendo levar a óbito (Brasil, 2009; Chippaux, 2012). Na visão epidemiológica, a família *Buthidae* tem causado maior interesse devido a grande parte das espécies ocasionarem mortes aos indivíduos (Cologna, 2010).

Marcussi et al (2011) afirmam que estes animais são considerados perigosos e o *Tityus serrulatus* possui entre suas características mais relevantes a alta toxicidade de sua peçonha. Assim, ao se falar em escorpiões, constata-se que os mesmos podem ser animais peçonhentos, por terem glândulas de veneno, que estão ligadas com outras estruturas, que englobam o ferrão (Prendini; Wheeler, 2005; Cardoso; Araújo, 2013). O seu agulhão ou ferrão é usado para espalhar o seu veneno que lhe serve tanto para a caça, como para defesa de seus possíveis predadores (Brasil, 2009).

De maneira geral, as diversas espécies de escorpiões exibem carapaça (prossoma) que contêm um par de quelíceras, um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de patas. O abdômen (opistossoma) está dividido entre o tronco (mesossoma) e a cauda (metassoma). No primeiro, aparecem o opérculo genital, os apêndices sensoriais (pentas) e os espiráculos (aberturas externas do pulmão), e no segundo estão presentes, no final de sua extremidade, o telson, que acaba em um ferrão utilizado para inocular o veneno, o que serve para a caça como também para a defesa de predadores (Figura 1) (Brasil, 2009).

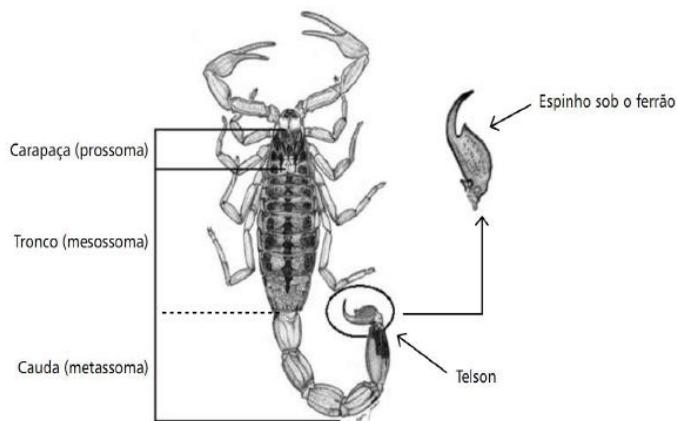


Figura 1 - Morfologia do escorpião, destacando a carapaça, a mesossoma, metassoma e o telson, onde se encontra o ferrão para inoculação do veneno.

Fonte: Brasil (2009).

Marcussi et al (2011) asseveram que é no telson que se localiza o adereço causador pela inoculação da peçonha chamado de ferrão e as glândulas originadas da mesma. A constituição corpórea dos escorpiões, em seu conjunto, é provida de cerdas que atuam como órgãos sensoriais apropriados para se apossarem de vibrações químicas, modificações de umidade e térmicas.

A família *Buthidae* é a mais relevante por sua quantidade de espécies e também por serem produtoras de veneno ativo, e abrange mais ou menos, 500 espécies, porém, os diversos gêneros dispõem de distribuição diferenciada. De modo geral, todos os escorpiões de relevância médica que existem no Brasil encontram-se inclusos ao

gênero *Tityus* (Torres et al, 2002), que será estudado de modo generalizado no segmento a seguir.

1.1.1 Gênero *Tityus*

Os escorpiões do gênero *Tityus*, pertencentes à subfamília *Tityinae* são os que ocasionam os principais casos de acidentes nos indivíduos no Brasil. Dentre este gênero, os mais importantes são os da espécie *Tityus serrulatus*, seguido por *Tityus bahiensis* e *Tityus stigmurus*. No entanto, vem-se observando também um aumento de notificações com as espécies *Tityus obscurus* e *Tityus trivittatus*, confirmando como também relevantes causadores de acidentes no país (Brasil, 2009).

No Brasil, atualmente, encontram-se descritas 13 espécies, com destaque como já dito, para o escorpião *Tityus serrulatus*, popularmente conhecido como escorpião amarelo (Figura 2A). Essa espécie é possuidora de manchas escuras sobre o tronco e na parte inferior do fim da cauda, podendo chegar a 7 cm de comprimento. O quarto anel de sua cauda apresenta dentinhos que configuram uma serra. Por ser reconhecida no Brasil como a espécie que tem o veneno mais potente, é também a que causa mais acidentes devido à toxicidade do veneno. As maiores incidências são encontradas no Nordeste e Sudeste do país, especificamente nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Brasil, 2015b).

O *Tityus bahiensis*, também popularmente denominado escorpião marrom (Figura 2B), possui corpo e cauda de coloração marrom escura, pode também apresentar cor avermelhada e pernas marrons alaranjadas com manchas marrons escuras. O macho tem as patas bem dilatadas, diferenciada pelos pedipalpos volumosos com um vão arredondado entre os dedos (Mendes, 2012). Essa característica é responsável por deter a fêmea no decorrer da “dança nupcial”, resultando na expulsão de espermátóforo no solo e a fecundação da fêmea. Cada fêmea pode ter dois partos com aproximadamente 20 filhotes, por ano, o que pode alcançar uma média de 160 filhotes no decorrer da vida (Lourenço, 2008). Esse escorpião é bem encontrado no estado de São Paulo, todavia, pode-se achar no Sul, sudeste, parte do Centro-Oeste e Nordeste, limitando-se aos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Mendes, 2012).

O *Tityus stigmurus* é denominado popularmente como escorpião do Nordeste (Figura 2C), tem grande semelhança ao *Tityus serrulatus*, tanto em seus comportamentos habituais quanto na coloração. Todavia, existe

uma faixa escura longitudinal na parte dorsal do seu mesossoma, seguido de uma mancha triangular no prossoma. Caracteriza-se também, por uma serrilha, porém, bem menos marcante, nos terceiro e quarto anéis da cauda (Brasil, 2009). Esta espécie é considerada a que mais provoca ocorrências no Nordeste, principalmente nos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte e Sergipe. Grande parte dos envenenamentos é avaliada como leves com ausência de letalidade das vítimas (Silva, 2007).



Figura 2 - Principais espécies de escorpiões responsáveis pelos acidentes no Brasil.

Em **A**: *Tityus serrulatus*, popularmente conhecido como escorpião amarelo e caracterizado por apresentar manchas escuras sobre o tronco e na parte inferior do fim da cauda, além de possuir no seu quarto anel da cauda dentinhos que configuram uma serra. Em **B**: *Tityus bahiensis*, também conhecido como escorpião marrom, caracterizado pelo seu corpo e cauda de coloração marrom escura e suas pernas marrom alaranjadas como pequenas manchas marrom escuras. Em **C**: *Tityus stigmurus*, popularmente conhecido como o escorpião do nordeste caracterizado por apresentar uma faixa escura longitudinal na parte dorsal do seu mesossoma, seguindo de uma mancha triangular no prossoma.

Fonte: Adaptado de Brasil (2009).

1.1.2 Escorpionismo

O escorpionismo é definido como sendo o envenenamento mediante picada de um escorpião (Albuquerque; Porto; Amorim, 2009) e tem sido referenciado, nos últimos tempos, como um problema de saúde pública bastante grave no Brasil e no mundo, proveniente da elevada incidência e do potencial do veneno de algumas espécies em causar quadros clínicos graves, sobretudo em crianças e idosos (Ribeiro et al, 2010; Duarte, 2011). São mais de um milhão e meio de casos no mundo e mais de 74.000 casos no Brasil (Brasil, 2015a). Este elevado número de casos de escorpionismo no Brasil, vem ainda aumentando, o que tem sido justificado pelo crescimento desordenado da população e, conseqüentemente, pela falta de infraestruturas e saneamento, unidos à

migração e facilidade na adequação dos escorpiões no contexto urbano, favorecendo a condições adequadas para sua infestação (Mendes, 2012, Brasil 2015b).

A frequência dos acidentes escorpiônicos eleva-se cada vez mais com o passar dos anos. Os dados informados pelo Programa Nacional de Controle de Animais Peçonhentos, para os anos de 1990 a 1993, destacaram que ocorriam, mais ou menos, 8 mil casos de acidentes ocorrem por ano, com prevalência média anual de 3 casos/100 mil habitantes. Os registros mais significativos eram observados em Minas Gerais e São Paulo, com média de 50% das referências, além de outros estados como Bahia, Rio Grande do Norte, Alagoas e Ceará que também apresentavam aumento significativo no número de registros. Grande parte dos casos era diagnosticada como leve, com mortalidade girando ao redor de 0,9%, sendo a maioria dos óbitos associados a acidentes com *T. serrulatus* (Reckziegel, 2013; Brasil 2015a).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de notificações (SINAN) por acidentes por animais peçonhentos do Ministério da Saúde do Brasil, os acidentes provocados por escorpiões abrangeram mais de 78 mil casos no ano de 2014. Ainda, entre o período de 2010 a 2014 no Brasil, o número de óbitos ocasionados pelo envenenamento com o escorpião abrangeu todas as faixas etárias no Brasil, dados na tabela 1:

Tabela 1 - Número de óbitos ocasionados por escorpiões no Brasil de acordo com a faixa etária.

| Idade | Número de óbitos |
|-------------|------------------|
| 0 a 9 | 166 |
| 10 a 19 | 54 |
| 20 a 39 | 89 |
| 40 a 59 | 65 |
| 60 a 79 | 35 |
| Acima de 80 | 7 |

Fonte: Brasil, 2015a

No ano de 2015, cerca de 74.598 acidentes foram ocasionados por escorpiões no Brasil e existem resquícios de que o número seja ainda mais elevado, já que diversos acidentes que envolvem animais peçonhentos ainda não foram registrados no SINAN. (Brasil, 2015a). Soma-se a isso, o fato da falta de interesse e conhecimento em se fazer a

notificação corretamente e também pelas falhas na identificação do quadro clínico por meio das equipes de saúde (Duarte, 2011)

1.1.3 Envenenamento

O veneno escorpiônico age principalmente nos canais para sódio (Na^+), onde as neurotoxinas que o compõem atuam na despolarização das partes terminais nervosas pós-ganglionares dos sistemas simpático, parassimpático e da medula da suprarrenal, o que favorece a liberação de neurotransmissores, como a epinefrina, norepinefrina e acetilcolina. Esses acontecimentos acarretam numerosas consequências locais (e.g., dor local, edema, eritema e equimose) e sistêmicas (e.g., náuseas, sudorese, bradicardia, agitação, pancreatite aguda, tremores e edema pulmonar) (Cardoso et al, 2009).

A propósito, Guimarães et al (2011) observaram que o veneno escorpiônico possui natureza complexa e age de maneira sistêmica no organismo. A avaliação hematológica está relacionada ao perfil traçado em doentes acidentados, o qual ajuda na resolução de alterações relevantes como leucocitose por liberação de hormônios, ação de mediadores farmacológicos nas células sanguíneas, alterações no hematócrito, redução de volume circulante, entre outras. O envenenamento por escorpião pode ocasionar um conjunto de efeitos sistêmicos. O primeiro deles é a dor local que, nos envenenamentos mais graves, pode não ser observada devido às manifestações sistêmicas (Dias et al, 2001).

Os resultados físico-farmacológicos provocados pelas toxinas escorpiônicas ocorrem frente à ação específica nos canais para sódio, seguido da despolarização da membrana das células excitáveis e posterior liberação de catecolaminas e acetilcolina pelas terminações nervosas dos sistemas simpático e parassimpático e zona medular adrenal. Dessa maneira, as toxinas atuam em diversos locais do organismo e proporcionam o surgimento do quadro clínico. O que agrava essas alterações e leva à insuficiência cardiocirculatória, edema pulmonar agudo, choque e morte (Cupo; Hering, 2002), demonstrando a relevância de se analisar o quadro clínico exibido no indivíduo envenenado.

1.2 VENENOS

Ao longo da evolução, determinados animais passaram a produzir substâncias venenosas com a finalidade de usar como defesa e/ou como

uma maneira de capturar suas presas. Desta forma, os elementos do veneno têm como foco danificar as funções vitais do animal que entra em contato com ele (Duarte, 2011). Os venenos de escorpiões são considerados misturas complexas produzidas por glândulas seromucosas e inoculadas por uma diversidade específica para cada animal. O veneno dos escorpiões pode diferenciar-se até dentro da mesma espécie, devido ao ambiente em que vive e ao tipo de alimentação. O veneno, de modo generalizado, representa ser uma mistura de proteínas básicas, peptídeos e outros elementos em menor quantidade, como açúcares, sais, serotonina e histamina, inibidores de protease, mucopolissacarídeos, proteases, hialuronidase, fosfolipase A2 e fosfoesterases (Diniz, 1978; Possani et al, 1981; Machado-de-Ávila, 2004; Duarte 2007). Possani et al (1999) asseveram que podem ser encontrados mais de 100.000 moléculas diversas nos venenos dos escorpiões, porém nem todo esse material é conhecido.

Maria et al (2005) acrescentam que, apesar dos venenos serem uma mistura de diversos compostos, a maior parte destes compostos não apresenta significância para o resultado tóxico do veneno. Todavia, por se referir a um material exógeno, esses mesmos compostos provocam a produção de anticorpos policlonais no animal imunizado, o que causa um efeito de diluição dos anticorpos realmente relevantes para neutralizar no produto final da toxicidade do veneno. De toda forma, já se reconhece que venenos de escorpião são singularmente ricos em proteínas de baixo peso molecular, essencialmente neurotoxinas e peptídeos, os quais possuem capacidade na interação, em específico, com diversos canais iônicos em membranas de células excitáveis (Cologna et al, 2009).

Para os autores, Pintar et al (1999) e Gurevitz et al (2007), o veneno dos escorpiões constitui-se essencialmente por uma união de neurotoxinas peptídicas, que estabelecem o componente tóxico básico do veneno. Essas toxinas demonstram características farmacológicas heterogêneas e algumas se tornam mais atuantes nos mamíferos, outras em alguns artrópodes e, por fim, as que podem agir sobre ambos. Numerosas vezes, esses elementos considerados mais tóxicos dos venenos significam somente uma parte de sua composição, o que pode comprometer a geração de anticorpos contra ele (Martin-Eauclaire et al, 2006).

Além das neurotoxinas, as demais moléculas do veneno, como os mucopolissacarídeos, as hialuronidases, as fosfolipases, a serotonina, os inibidores de proteases e os liberadores de histaminas, provocam uma ação em determinado local e podem servir indiretamente como

auxiliares no processo de envenenamento, ao participar no aumento da absorção e disseminação do veneno (Possani et al, 1999; Pessini et al, 2001).

1.2.1 Neurotoxinas escorpiônicas

As neurotoxinas escorpiônicas são consideradas como fundamentais no efeito tóxico do veneno dos escorpiões. Elas são separadas em quatro famílias conforme os canais iônicos que interagem: canais para sódio (Na^+), canais para potássio (K^+), canais para Cálcio (Ca^{2+}) e canais para cloro (Cl^-), com destaque para neurotoxinas que atuam nos canais para Na^+ e canais para K^+ , que são caracterizados como as principais neurotoxinas do veneno (Becerril, Marangoni; Possani, 1999; Dhawan et al, 2002). De uma forma geral, elas são consideradas proteínas básicas de baixo peso molecular, com elevada afinidade com os canais iônicos, ocasionando uma modificação do potencial de ação deste canal e gerando um efeito tóxico (Becerril, Marangoni; Possani, 1999; Duarte, 2012).

Esses canais iônicos constituem-se de uma superfamília proteica e contam com aproximadamente 140 membros já descritos. Eles são formados por proteínas integrais, presentes nas membranas plasmáticas das células gerando poros. Estes poros são responsáveis pela entrada e saída de íons das células, regulando, assim, o fluxo de íons, o que proporciona uma transmissão de sinais elétricos e mantém o funcionamento perfeito da vida celular, conseqüentemente da homeostasia no corpo humano (Catterall et al, 2007). Os canais iônicos são, então, responsáveis por controlar as funções biológicas, tais como a neurotransmissão, contração muscular esquelética, expressão gênica e secreção de eletrólitos (Catterall et al, 2007; Mendes, 2012).

As neurotoxinas existentes nas peçonhas de escorpiões apresentam, como foco biológico, o acometimento e a paralisação das presas, porém representa papel concernente na proteção contra predadores (Bosmans; Tytgat, 2007). Essas neurotoxinas pertencem aos elementos mais destacados da peçonha de escorpiões e alteram os ajustamentos de permeabilidade de membranas estimuláveis mediante a reciprocidade singular com canais para Na^+ , para K^+ , para Ca^{2+} e para Cl^- (Possani et al, 1999).

São poucas as neurotoxinas escorpiônicas já descritas que atuam nos canais para Cl^- . No geral, são proteínas de cerca de 36 aminoácidos e 4 pontes dissulfeto. A principal proteína desta família é a clorotoxina, uma neurotoxina do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus* conhecida

por ser a primeira toxina identificada e caracterizada a agir neste canal. Essa toxina apresentou uma propriedade de se ligar especificamente ao receptor MMP2 associado a canais para cloro, altamente expresso em tumores de células da glia, mas não em tecidos normais, podendo, então, ser considerada um potencial biomarcador para diagnóstico de câncer (Mamelak et al, 2006; Huang et al, 2011; Rjeibi et al, 2011). Assim, devido a alta similaridade entre proteína escorpionicas de espécies diferentes, atualmente, diversos pesquisadores procuram por proteínas análogas às clorotoxinas em outros venenos de escorpiões (Duarte, 2012).

As neurotoxinas que agem no canal para Ca^{2+} ainda não têm sua estrutura definida e são poucas as identificadas. No entanto, a importância já é esclarecida, pois a alteração das concentrações de Ca^{2+} intracelular são importantes na regulação de múltiplas funções celulares, como contração, secreção, motilidade, proliferação e apoptose. Junto com os canais para Na^+ e para K^+ , o canal para Ca^{2+} é responsável pelos sinais elétricos necessários para a geração e condução do potencial de ação em células musculares e nervosas. Esses canais se abrem e se fecham em função da voltagem da membrana, permitindo um movimento rápido de íons apropriados em função de seus gradientes de concentração, de forma que correntes iônicas passam para dentro ou para fora da célula, despolarizando, repolarizando ou hiperpolarizando a membrana (Marcussi et al, 2011; Mendes, 2012).

A ação de uma neurotoxina no canal para Ca^{2+} pode levar a uma elevação da concentração interna de Ca^{2+} , gerando a fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática e promovendo a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, que, então, se liga a receptores específicos na superfície externa do neurônio ou em células efetoras, tais como as de músculo esquelético (Valdivia, et al, 1992; Zamudio et al, 1997; Marcussi et al, 2011). A liberação destes neurotransmissores altera a neurotransmissão glutamatérgica, envolvida em diversas funções fisiológicas, como os processos de aprendizagem e a formação da memória (Bliss; Collingridge, 1993) e na regulação do sistema nervoso central, podendo levar à morte neuronal (Lent, 2004) ou conduzir a patologias musculares como a arritmia cardíaca (Hewer; Meyer, 2003).

As neurotoxinas que interagem com canais para K^+ são moléculas proteicas formadas por 30 a 40 aminoácidos e estabilizadas por 3 ou 4 pontes dissulfetos. Essas toxinas atuam como bloqueadores deste canal impedindo a repolarização da membrana para a terminação do potencial de ação (Rodríguez De La Veja; Possani, 2004). Existem cerca de 120 toxinas escorpionicas que atuam em canais para K^+ caracterizadas

(Duarte, 2007). No geral, elas não apresentam muita toxicidade em mamíferos, sendo consideradas como insetoxinas, já que são bem tóxicas em insetos. No entanto, alguns estudos relatam que elas podem estar associadas a múltiplas patologias humanas, como hipertensão, asma e respostas imunes a infecções e inflamações (Cologna et al, 2011).

As neurotoxinas mais tóxicas em mamíferos são as que interagem com o canal para Na^+ . Essas proteínas são constituídas por 60 a 76 aminoácidos estabilizadas por 4 pontes de dissulfetos (Machado-de-Ávila et al, 2004). Essas moléculas neurotóxicas ocasionam diversos efeitos ao interagir com os canais para Na^+ , mas isso depende do sítio de ligação (Rodríguez De La Vega et al, 2015). Os canais para Na^+ que dependem de voltagem são componentes decisivos para a atividade de vida das células. São alvos moleculares para uma larga gama de neurotoxinas que atuam em seis ou mais sítios de receptores distintos na proteína do canal, o qual altera expressivamente a sua função (Cestéllé; Catterall, 2000). Na fisiopatologia do escorpiônismo, os canais para Na^+ são caracterizados como os mais relevantes, pois as neurotoxinas principais contidas em seus venenos têm afinidade por eles (Rodríguez De La Vega et al, 2015).

As moléculas neurotóxicas, que se ligam no segmento 3-4 do sítio 3 do domínio IV do canal de Na^+ , são denominadas de α -toxinas (figura 3) e são consideradas as mais tóxicas do veneno, e as que se ligam no segmento 3-4 do sítio 4 do domínio II do canal são denominadas de β -toxinas (figura 3). No sítio 3, as α -toxinas atuam no retardo do processo de inativação ou fechamento do canal, levando ao atraso na transmissão dos impulsos nervosos. Pressupõe-se que uma sequência de três aminoácidos que ligam os sítios 3 e 4, operam como uma porta de inativação desses locais (Rodríguez-de-la-Vega; Possani, 2004; Billen; Bosmans; Tytgay, 2008; Cologna et al, 2011). Ao passo que as β -toxinas agem no sítio 4 do canal induzindo uma mudança para potenciais de membrana mais negativos através da ativação do canal, ou seja, aumentam a sensibilidade do canal à ela, fazendo com que este permaneça aberto por mais tempo (Duarte, 2012).

De uma forma geral, essas neurotoxinas que agem no canal para Na^+ possuem um alto grau de identidade estrutural, apresentando uma topologia de $\beta\alpha\beta\beta$ formada por três folhas beta-pregueadas e uma alfa hélice. Essa estrutura terciária é formada com uma grande quantidade de aminoácidos estritamente conservados nas suas estruturas primárias, como as oito cisteínas que ocasionam na formação de 4 ligações dissulfeto, responsável por dar a estabilidade estrutural a essas toxinas

(Possani et al, 1982; Oren et al, 1998; Machado-de-Ávila et al, 2004; Rodríguez De La Veja e Possani, 2004; Alvarenga et al, 2005). A interação entre essas neurotoxinas e o canal ocorre através da superfície hidrofóbica composta pelos resíduos de aminoácidos aromáticos e alifáticos (Sun et al, 2003; Wang et al, 2003), como é o caso dos aminoácidos de triptofano nas posições 30 e 54 e lisina na posição 12 que já foram vistos como resíduos chaves para interação com o canal (Hassani et al, 1999). Além deles, o aminoácido de lisina na posição 1 demonstrou ter um papel importante na toxicidade destas toxinas (Possani et al, 1985).

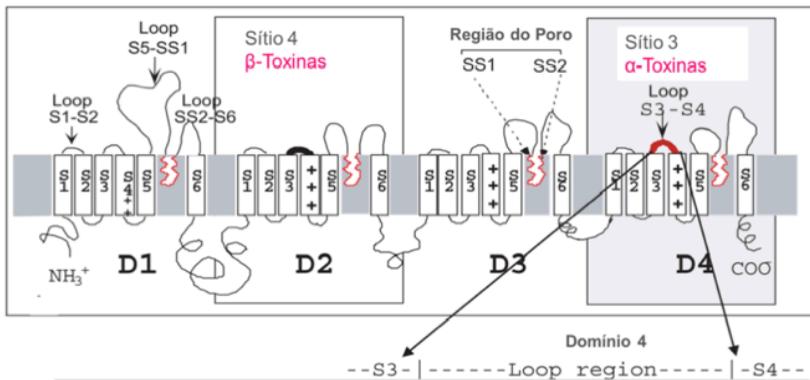


Figura 3 – Estrutura de um canal para sódio.

As β-toxinas se ligam no domínio II do canal, em um *loop* entre os segmentos transmembrana 3 e 4 enquanto as α-toxinas se ligam no domínio IV, em *loop* também entre os segmentos 3 e 4.

Fonte: DUARTE (2011).

1.2.2 Ts1

A Ts1, também chamada de TsTX-I; toxina γ; Toxin T2-IV; Toxin Ts7; Ts VII; Toxin VII; TsTX-VII; Tityustoxin VII; Toxin III-10; Toxin II-11, é a toxina mais predominante no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, a qual representa aproximadamente 15% do seu peso solúvel (Pessini et al, 2001). Segundo Barhanin et al (1984), ela foi a primeira toxina caracterizada desta peçonha. A Ts1 é extremamente potente e interessante, pois interage com o sítio receptor 4 de canais para Na⁺, ou seja, é uma β-toxina, considerada tóxica tanto para mamíferos quanto

para insetos. A Ts1 é a causadora de muitos efeitos do envenenamento por *Tityus serrulatus*. Seu poder é tão grande que sua DL-50 (dose letal responsável por matar 50% dos animais desafiados), via intravenosa, é de apenas $76 \pm 9 \mu\text{g}/\text{kg}$ e conduz ampla liberação de catecolaminas, com elevação da pressão arterial (Vasconcelos et al, 2005).

A estrutura da Ts1 (Figura 4) foi determinada por cristalografia de raios X pela primeira vez em 1999, com uma resolução de 1.73 \AA (Polikarpov et al, 1999) e depositada no banco de dados do PDB (*Protein Data Bank*) pelo código de 1B7D. Em 2003, Pinheiro et al (2003) depositaram no banco de dados do PDB, pelo código 1NPI uma estrutura com melhor resolução (1.16 \AA).

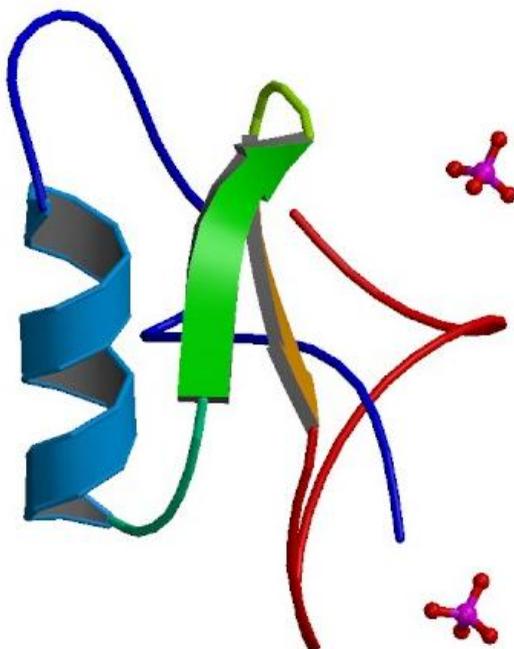


Figura 4 - Estrutura tridimensional da toxina Ts1 de *Tityus serrulatus* (PDB: 1NPI).

Em verde, amarelo e vermelho estão as fitas β -pregueadas antiparalelas, e em azul a α -hélice. Dois íons de fosfato são apresentados também com átomo de fosfato em rosa e os quatro oxigênios em vermelho.

Fonte: PDB: código 1NPI

Em ambos os casos, foi visto que a Ts1 é formada por três fitas- β pregueadas antiparalelas e uma α -hélice conectadas por quatro pontes dissulfeto. Um fato curioso é que a alça hidrofóbica I na molécula da Ts1 é mais curta do que em todas as outras β -toxinas e tem o mesmo comprimento da alça presente em α -toxinas. Também foi visto que a análise estrutural indica que as posições de íons de fosfato marcam os plausíveis sítios de ligação ao canal para Na^+ (Pinheiro et al, 2003).

1.2.3 Sintomatologia

O veneno do escorpião possui uma alta toxicidade com um quadro clínico grave. De uma forma geral, a gravidade do quadro de envenenamento vai depender de diversos fatores, destacando-se a espécie e o tamanho do escorpião, bem como a quantidade de veneno inoculado, a massa corporal e a sensibilidade do paciente ao veneno (Cupo; Marques; Hering, 2003; Duarte, 2007; Silva, 2007). A literatura ressalta que a evolução do diagnóstico e o tempo entre a picada e a administração do soro estão diretamente relacionados com a manutenção dos sinais vitais (Ravelo et al, 1996). Também é possível encontrar relatos em que a idade do paciente está diretamente relacionada com o prognóstico e a gravidade dos sintomas, bem como a ocorrência de óbitos nos casos em crianças com idade inferior a 14 anos, sendo que os casos mais graves estão relacionados a idades inferiores a 7 anos (Silva, 2007). Segundo Cupo; Marques; Hering (2003) as principais manifestações são:

I) *Manifestação local*: ocorre praticamente em todas as vítimas escorpiônicas e sua intensidade pode variar de acordo com o local e indivíduo afetado. Dessa forma, torna-se necessário a busca imediata de atendimento médico. Os principais sintomas são: queimação, agulhadas ou dores latejantes e com o decorrer do tempo a dor vai se irradiando para locais próximos à picada. Pode haver parestesias (sensação anormal e desagradável sobre a pele). Quando ocorre o envenenamento mais grave, as manifestações podem ser sistêmicas, mas há melhora das condições gerais do paciente com o atendimento adequado.

II) *Manifestações sistêmicas*: com a liberação de acetilcolina pode haver o aumento das secreções das glândulas lacrimais, nasais, sudoríparas, da mucosa gástrica e do pâncreas, provocando lacrimejamento, rinorreia, sudorese e vômitos. Pode ainda ser notado tremores, espasmos musculares, miose, bradicardia, hipotensão, priapismo e hipotermia. Consequentemente, o quadro clínico pode evoluir, devido à liberação de catecolaminas, para a presença de

midríase, arritmias respiratórias e cardíacas, taquicardia, hipertensão arterial e, inclusive, pode ocorrer falência cardiocirculatória e edema agudo. Cefaleia e convulsões são resultados da ocorrência da encefalopatia hipertensiva e hemiplegias (relacionada com infarto cerebral); este fato é descrito na literatura como raro.

1.2.4 Tratamento

Segundo as diretrizes preconizadas pelo Ministério da Saúde e a OMS, no caso de acidentes com animais peçonhentos, recomenda-se que é de suma importância identificar o agente causador do acidente através do diagnóstico clínico e exames bioquímicos (e.g. função renal), para que possa ser prescrita a soroterapia adequada de acordo com gravidade do acidente, conforme a figura 5 descreve:

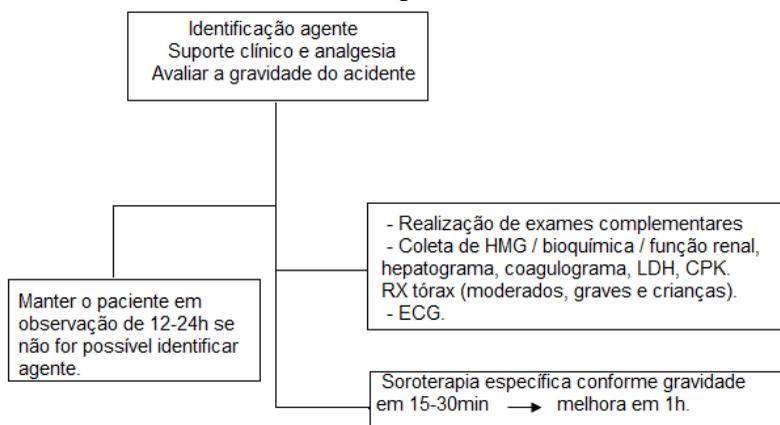


Figura 5 - Fluxograma de atendimento de acidente escorpionic

Fonte: Leis e Chebabo, 2016, p. 13.

Para o envenenamento pelo escorpião, o tratamento indicado para o local afetado é analgesia, e, para isso, deve ser realizada a infiltração de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (1 mL a 2 mL para crianças; 3 mL a 4 mL para adultos) no local da picada com intervalos de 30 a 60 minutos ou uso de dipirona na dose de 10 mg/kg de peso a cada seis horas (Leis; Chebabo, 2016). Além disso, a medida terapêutica mais aceita é o tratamento realizado com o soro antiescorpionic e sua eficácia está associada à rapidez com que é realizado o início do tratamento, à qualidade do soro utilizado e sua dosagem. A produção do soro para

tratamento de picadas de escorpiões enfrenta alguns problemas, tais como a dificuldade em se obter o veneno (matéria-prima), questões bioéticas e alto custo de sua produção (Duarte, 2007; Soares, 2012).

A dosagem do soro utilizado no tratamento vai depender do grau de envenenamento e das manifestações clínicas apresentadas. De acordo com as manifestações clínicas, o Ministério da Saúde prescreve a dosagem de soro antiescorpiónico, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Manifestações clínicas mais frequentes em acidentes escorpiónicos

| Classificação | Manifestações Clínicas | Soroterapia (número de ampolas) |
|----------------------|--|--|
| Leve | Dor e parestesias locais | - |
| Moderado | Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, náuseas, vômitos, sudorese, sialorréia, discretos, agitação, taquipneia e taquicardia. | 2 a 3 |
| Grave | Além das citadas na forma moderada, presença de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorréia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque. | 4 a 6* |

Fonte: Duarte, 2007, p. 10.

* Na maioria dos casos graves, quatro ampolas são suficientes para o tratamento, visto que neutralizam o veneno circulante e mantêm concentrações elevadas de antiveneno circulante por pelo menos 24 horas após a administração da soroterapia.

O soro antiescorpiónico pode ser administrado 15 a 30 minutos após o acidente e os sintomas apresentam melhora em uma hora, sendo recomendado o seu uso independente do tempo do acidente. Quanto aos sintomas cardíacos, podem demorar um pouco mais para desaparecerem, bem como as alterações eletrocardiográficas (Leis; Chebabo, 2016).

Podem ocorrer reações adversas, como anafilaxia e doença do soro, quanto ao tratamento com imunoterápicos devido à presença de proteínas alergênicas não próprias ou pela formação de uma resposta

imunológica secundária de sensibilização prévia e pela deposição de imunocomplexos, respectivamente. Para evitar esse quadro, alguns médicos fazem uso de anti-histamínicos antes dos pacientes receberem o soro (Duarte, 2007).

1.3 ANTÍGENO E ANTICORPO

Um antígeno (Ag) pode ser compreendido como qualquer molécula que, ao entrar no organismo, possua a capacidade de produzir uma resposta imunológica, induzindo a produção de um anticorpo (Ac) por células B (BCR, do inglês *B-cell receptor*) (Muro; Ferreira; Gonzaga, 2009). Entende-se, portanto, de acordo com Querido (2016) e Melo (2012) que o antígeno é qualquer agente que seja capaz de se unir exclusivamente aos integrantes da resposta imune, como linfócitos e anticorpos solúveis.

Estruturalmente, os antígenos se caracterizam por apresentar estruturas químicas que possibilitam complexar com um anticorpo específico formando um complexo Ag-Ac, regido por meio de conexões não covalentes. Essas anuências são semelhantes ao que ocorre com as reações que abarcam os complexos enzimas-substratos. Assim sendo, também são reversivas (Harmening, 2002).

Os anticorpos, por sua vez, são proteínas que identificam um antígeno de forma exclusiva e com intensa afinidade (Lenz, 2004). Os Acs são classificados como pertencentes às famílias das glicoproteínas, mais especificamente as imunoglobulinas (Ig), produzidos pelas células B do organismo. O modo mais simples e direto dos acs atuarem no corpo contra agentes patogênicos ou seus produtos tóxicos é mediante a neutralização deste agente. Nesse mecanismo, o ac une-se ao patógeno (ou à toxina), neutralizando sua ação nas células (Melo, 2012).

A percepção dos mecanismos de produção de anticorpos é, com certeza, uma das maiores vitórias das ciências biológicas neste século, frente a sua complicação, mas essencialmente pelas melhorias que expressam ou significam para a humanidade (Lenz, 2004). Os anticorpos são elaborados com a função primordial de imobilizar e eliminar o antígeno que provocou a sua produtividade. Esse processo de aniquilação é estruturado de múltiplas formas, mediante à estabilização do complemento, opsonização, reação anafilática (degranulação de mastócitos), neutralização da substância, aglutinação, etc. (Melo, 2012).

Estruturalmente, as imunoglobulinas (Ig) são formados por quatro subunidades unidas entre si por quatro pontes dissulfeto, como apresentado na Figura 6. Estas quatro subunidades são formadas por

duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L). A estrutura das Ig assemelham-se com a letra “Y”. Na parte superior onde estão localizadas as cadeias L, existem dois sítios semelhantes, responsáveis pela ligação com o antígeno, e que favorece a união entre eles, e, deste modo, pode formar o complexo antígeno-anticorpo (Lenz, 2004). As Igs, são classificadas em IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. Dentre elas, a IgG representa 75% das Ig totais e é considerada o anticorpo principal das respostas imunes (Lenz, 2004).

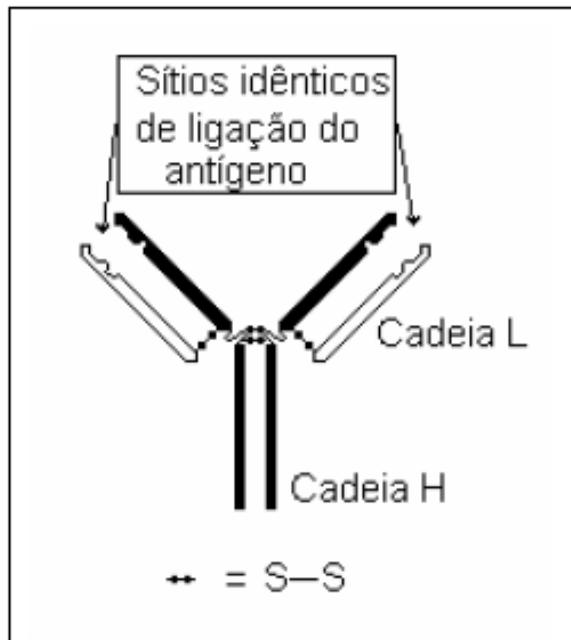


Figura 6 - Estrutura geral de uma imunoglobulina.

Fonte: Lenz (2004)

1.3.1 Epítomos

Identifica-se como epítopo a região de um antígeno que seja propenso a ativar resposta imunológica induzindo a formação de um anticorpo. Assim, são áreas nas moléculas dos imunógenos que se acoplam aos receptores celulares e aos anticorpos, ou seja, o sítio de ligação específico em que é reconhecido por um anticorpo ou por um TCR. O epítopo, também chamado de determinante antigênico é, então, definido

como sendo a porção mínima do antígeno que apresenta força para produzir uma resposta imune (Almeida, 2002; Laurentis, 2008). De uma forma geral, um antígeno possui vários epítopos, ao passo que os anticorpos apresentam somente um tipo de receptor para este antígeno (Parham, 2011).

Os epítopos são as regiões do antígeno mais reativas com o anticorpo e físico-quimicamente possuem como característica ser hidrofílico e ter alta acessibilidade ao solvente (Machado-de-Ávila et al, 2014). Como já dito, o epítipo pode ser reconhecido como uma reunião de aminoácidos derivados de antígenos proteicos, que podem relacionar-se com receptores de células B ou com os receptores de célula T, o que procede em uma resposta imune (Mendes, 2012). A cumplicidade que acontece, é porque as células B e T apresentam moléculas capazes de reconhecer antígenos com peculiaridades diferentes. O receptor de célula B interrelaciona-se de forma direta com o antígeno e o receptor de células T identifica os antígenos processados e apresentados como peptídeos unidos às proteínas de superfície chamadas de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (Murphy, 2014).

Um epítipo de uma proteína pode ser caracterizado como contínuo ou descontínuo. O epítipo contínuo é também denominado sequencial ou linear e é caracterizado como sendo um fragmento sucessivo na sequência proteica. O epítipo descontínuo, também denominado de epítipo conformacional, é formado por múltiplos fragmentos espalhados no decorrer da continuidade da proteína e aglomerados na proximidade espacial quando a proteína é enovelada (Huang; Honda, 2006; Machado-de-Ávila, 2011).

A imunogenicidade e a antigenicidade de uma proteína não dependem somente de sua estrutura primária (isto é, da sequência de aminoácidos), mas, também, das estruturas secundárias, terciárias e até quaternárias. Assim, as diferentes formas espaciais que um epítipo apresenta em uma proteína podem alterar a ligação do anticorpo de diferentes formas. A área relevante para a imunogenicidade deve permanecer acessível, na superfície da molécula (Figura 7) (Teva; Fernandes; Silva, 2009).

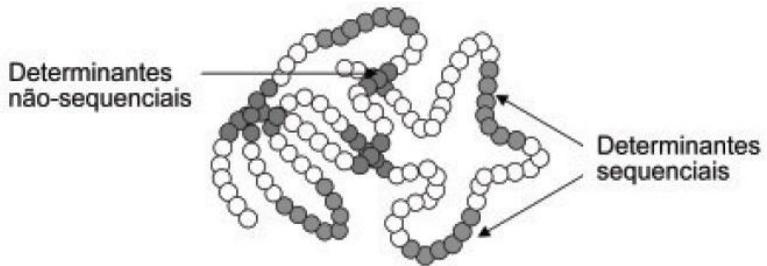


Figura 7 - Distribuição dos determinantes antigênicos (epítomos) sequenciais (lineares) e não sequenciais (conformacionais) em uma molécula proteica.

Fonte: Teva; Fernandes; Silva (2009)

A Figura 8 demonstra os dois tipos de epítomos. Na figura 8A, a continuidade de aminoácidos que fazem parte do epítomo representado pelas letras E-P-I-T-O-P-O, acompanham a estrutura primária da proteína, indicando que este é um epítomo linear. Já na figura 8B, a sequência de aminoácidos está representada pelo mesmo conjunto de letras, em que, os aminoácidos não seguem a estrutura primária da proteína, mas se encontram próximos estruturalmente, indicando que, neste caso, tem-se um epítomo conformacional.

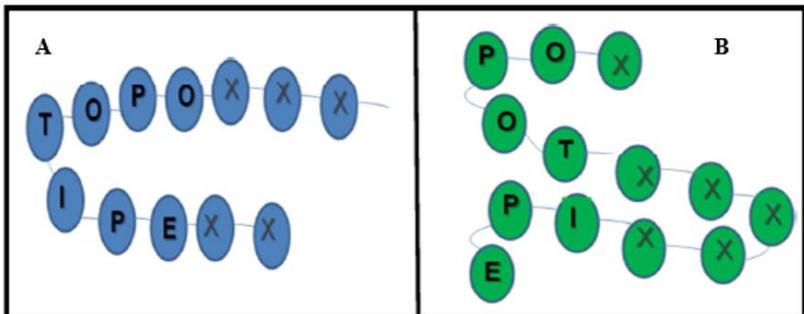


Figura 8 - Representação esquemática dos diferentes tipos de epítomos. Em **A**, um epítomo linear e em **B** um epítomo conformacional.

Fonte: Machado-de-Ávila (2011).

Na maior parte dos antígenos, quanto maior for a molécula, maior será a quantidade de epítopo; e quanto maior a complexidade, maior será a imunogenicidade. Um antígeno complexo pode conter diversos determinantes antigênicos, sendo que alguns são mais eficazes na condução da resposta imune e são conhecidos por imunodominantes (Teva; Fernandez; Silva, 2009). Assim, diversos pesquisadores vêm estudando e identificando epítomos em diferentes antígenos para selecionar quais são os que apresentam melhor eficácia. (Machado-de-Ávila, 2011). Devido a todos esses fatos, torna-se de máxima relevância conhecer e mapear os epítomos, para, assim, poder identificar e/ou escolher um peptídeo com verdadeiro potencial vacinal ou terapêutico.

1.3.2 Mapeamento de epítopo

As metodologias para mapeamento dos epítomos de uma proteína, podem compreender, conforme Machado-de-Ávila, (2011), métodos mais tradicionais como método imunoquímico de SPOT, estudos de cristalografia de raios-X e métodos de predição computacional. A técnica de cristalografia é considerada o padrão ouro na identificação dos epítomos, pois não há limitações relacionadas ao tamanho da molécula, além de ser um processo quase automatizado (Edwards; et al, 2000). A cristalografia de raios-X é considerada o método mais adequado e preciso para a análise de epítopo, esta técnica garante a identificação precisa de epítomos contínuos e conformacionais (Wang; Yu, 2004). No entanto, é uma técnica cara que precisa de bastante quantidade de amostra com alto grau de pureza, requisitando alto controle de qualidade de processos de purificação (Edwards; et al, 2000), agregando custos elevados, além de ser uma técnica que comumente é demorada. Por outro lado, graças à resolução por cristalografia de raios-X de um complexo Ag-Ac foi visto que um epítopo é composto por, aproximadamente, 10 a 20 aminoácidos (Machado-de-Ávila, 2011).

A ressonância magnética nuclear (RMN) também tem sido aplicada para o mapeamento de epítomos, uma vez que esta abordagem fornece dados sobre a estrutura, dinâmica, e energia de ligação do complexo Ag-Ab e é realizada em solução onde não são necessários cristais, porém a RMN limita-se a pequenas proteínas (Potocnakova; Bhide; Pulzova, 2016).

Os métodos de mapeamento estrutural de epítomos, no qual compreendem métodos tradicionais como a cristalografia e a RMN, interpretam a estrutura protéica que compreende resíduos em contato

direto com um anticorpo, mas muitas vezes não conseguem revelar a contribuição de aminoácidos na força de ligação. Além disso, a maioria destes métodos são caros, trabalhosos, demorados e muitas vezes não conseguem identificar todos os epítomos (Potocnakova; Bhide; Pulzova, 2016).

No entanto, identificar os epítomos *in silico* seria um modo mais barato, que aproveita informações de banco de dados validadas por meio das técnicas mais tradicionais, como as supracitadas, carecendo somente de um computador e conhecimentos básicos a respeito de proteínas.

Graças aos avanços tecnológicos em genômica, proteômica, e nas técnicas de mapeamento de epítomos, grandes quantidades de dados estão sendo gerados e organizadas em bancos de dados (Potocnakova; Bhide; Pulzova, 2016).

Para se presumir o local dessas regiões ou epítomos antigênicos, necessita-se de algoritmos estruturados que calculem e pontuem diversas características físico-químicas na proteína alvo, como: hidrofobicidade, acessibilidade, flexibilidade e a estrutura secundária da proteína (Pellequer; Westhof, 1993), informações estas que definiram a interação de um complexo ag-ac. Muitos algoritmos de predição de antigenicidade foram desenvolvidos para prever quais fragmentos de peptídeos sintéticos são suscetíveis de originar anticorpos anti-peptídicos capazes de reagir com a proteína (Van Regenmortel, 1996). Os epítomos ao serem definidos por meio do mapeamento de epítomos, têm sido utilizados como componentes de tratamentos preventivos e terapêuticos com sucesso (Hewer; Meyer, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Predizer e caracterizar imunoquimicamente um epítipo conformacional da Ts1, principal toxina do veneno do escorpião *Tityus Serrulatus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Predizer um epítipo conformacional *in silico* utilizando os programas *Swiss Model*, *Java Protein Dossier* e *SwissPDBviewer*;
- Desenhar *in silico* um peptídeo a partir dos aminoácidos preditos como epítipo conformacional;
- Sintetizar quimicamente o peptídeo desenhado utilizando a técnica FMOC-Sínteses;
- Produzir um anticorpo policlonal capaz de neutralizar a ação do veneno do *Tityus Serrulatus*, utilizando, para isso, o peptídeo sintético como imunógeno.

3 METODOLOGIA

3.1 PREDIÇÃO DE EPÍTOPO CONFORMACIONAL

Para a predição dos epítomos conformacionais, foi empregado o programa *Sting Millennium* (Neshich et al 2003). Este programa é um banco de dados que oferece uma variedade expressiva de informações sobre estruturas moleculares e informações estruturais para proteínas obtidas do banco de dados PDB (Berman et al, 1999). Por meio destas informações, o *Sting Millennium* oferece em uma janela os parâmetros biológicos e físico-químicos da proteína. Para fazer a predição do epítopo conformacional, utilizou-se a metodologia descrita em Machado-de-Ávila et al (2014), selecionando os aminoácidos que apresentavam alta acessibilidade ($100 A^2$) ao solvente na proteína da Ts1 (código de PDB 1NPI).

3.2 DESENHO DE UM PEPTÍDEO *IN SILICO*

A partir dos aminoácidos, preditos como epítomos por meio de parâmetros físico-químicos, foi desenhado um peptídeo que representou a região epitópica da Ts1, utilizando a metodologia descrita em Machado-de-Ávila et al (2014). Para isso, estes aminoácidos preditos foram localizados manualmente na estrutura 3D da toxina, usando o programa *SwissPDBViewer* (Berman et al,1999). Em seguida, respeitando a menor distância espacial entre os resíduos e seus resíduos-vizinhos espaciais, o peptídeo foi proposto.

3.3 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

O peptídeo selecionado como epítopo foi sintetizado através do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina), que usa aminoácidos especiais para a realização da síntese *in vitro*. Para isso, utilizou-se do protocolo descrito por

Merrifield, 1969 e adaptado por Machado-de-Ávila (2011). Esse método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Esses aminoácidos possuem um grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil-metil-oxicarbonila), e sua cadeia lateral também é protegida para evitar possíveis reações indesejadas. Cada etapa, onde é adicionado um aminoácido ou feita a desproteção de um grupamento protetor, foi monitorada através do teste de Kaiser, para poder identificar as aminas livres (Moreira et al, 2001).

A síntese foi realizada em uma seringa contendo a resina e tem início com a adição de dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Em seguida, é adicionada a piperidina 20% por 20 minutos para eliminar o Fmoc da resina, e então são realizadas três lavagens com DMF e uma com diclorometano (DCM). Para verificar o resultado, realiza-se o teste de Kaiser que confirma a desproteção ou não do aminoácido; com o aminoácido desprotegido, iniciou-se a etapa de acoplamento. Nessa etapa, o primeiro aminoácido a ser acoplado é adicionado aos ativadores da função carboxila, a oxyma e o diisopropilcabodiimida (DIPC), e são deixados por 30 minutos na seringa. Após a acoplagem, duas novas lavagens intercaladas com DMF e metanol e uma com DCM foram realizadas e foi iniciada a etapa de desproteção. Nessa etapa, o grupamento Fmoc do aminoácido acoplado foi removido com a adição de piperidina 20% por 20 minutos e foram feitas as lavagens com DMF novamente e, assim, o protocolo de acoplagem do segundo aminoácido é reiniciado. Esse ciclo de acoplagem/desproteção é realizado até que todos os aminoácidos do peptídeo sejam acoplados.

Após o último aminoácido ser acoplado, agora sem o grupamento Fmoc, dando fim aos ciclos, o peptídeo é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem, onde acontece a eliminação dos grupamentos protetores da cadeia

lateral. Para isso, o peptídeo foi incubado por 3 horas com uma solução de clivagem contendo 2,5% de Triethylsilane (TES), 2,5% de água destilada e 95% de Ácido Trifluoracético (TFA). Após esse período, filtrou-se o conteúdo recolhendo a solução em um tubo falcon e adicionando-se 20 mL de éter etílico refrigerado, para precipitar o peptídeo (emulsão esbranquiçada). O peptídeo foi separado do éter por centrifugação por 10 minutos em 4°C a 10.000 rpm. Em seguida, o peptídeo foi liofilizado ficando disponível para os testes de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês: *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*).

3.4 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

3.4.1 Imunização e obtenção dos soros

O peptídeo sintetizado foi utilizado como imunógeno com o intuito de produzir anticorpos neutralizantes contra a Ts1, o veneno de *Tityus serrulatus* e o peptídeo. Para isso, doze camundongos *Swiss*, fêmeas na faixa de 18-22 g foram utilizados, divididos em três grupos (grupo controle positivo, controle negativo e grupo peptídeo) compostos por quatro camundongos em cada grupo. A metodologia utilizada foi baseada no protocolo de Machado-de-Ávila et al., 2011, onde a imunização foi realizada semanalmente durante 9 semanas, sendo que, em todas as aplicações, os camundongos receberam junto com a amostra, adjuvante de *Freund's* diluído em tampão fosfato salina (PBS, do inglês: *Phosphate-Buffered Saline*). O adjuvante de *Freund's* utilizado foi o completo para a primeira imunização e o incompleto para as demais. Antes da primeira imunização coletou-se o sangue dos animais para obtenção do soro pré-imune (PI). O método de aplicação consistiu em:

- **Grupo peptídeo:** 9 injeções por via subcutânea contendo 0,050mg/camundongo de peptídeo, adjuvante de *Freund's* e PBS, com intervalos de 7 dias durante 9 semanas;

- **Grupo controle positivo:** 9 injeções por via subcutânea com 0,018mg/camundongo de veneno *Tityus serrulatus* com adjuvante de *Freund's* e PBS com intervalos de 7 dias durante 9 semanas;

- **Grupo controle negativo:** 9 injeções de 0,0014mg/camundongo de BSA (soro albumina bovino, do inglês: *bovine albumin serum*) com adjuvante de *Freund's* e PBS com intervalos de 7 dias durante 9 semanas;

Uma semana após a última imunização, os animais tiveram seu sangue coletado e se obteve seu soro (soro anti-peptídeo, antiveneno ou anti-BSA) após duas centrifugações a 12.000 rpm por 10 minutos. O soro foi armazenado a -20°C para os ensaios de ELISA. Ressalta-se que todos os procedimentos, envolvendo a utilização desses animais, foram avaliados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da UNESC com o protocolo no 020/2016-2 (ANEXO A).

3.4.2 Ensaio de ELISA

Uma placa de ELISA de 96 poços recebeu o veneno *Tityus serrulatus* em uma concentração de 3 µg/µL ou o peptídeo sintetizado à 50 µg/µL ou BSA à 1 µg/µL em 0,02 M de tampão de incubação (bicarbonato de sódio, pH 9,6) com volume final de 100µl/poço, os quais foram sensibilizados durante uma noite a 4°C. Em seguida, após lavagem com solução TBS-Tween e bloqueio da placa com caseína 2%, adicionou-se na placa diferentes concentrações de soro anti-peptídeo, ou soro pré-imune (controle negativo) ou soro antiveneno (controle positivo) ou soro anti-BSA e deixou-se incubando por uma hora a 37°C. A detecção da ligação dos antígenos com os anticorpos foi realizada pela adição do anticorpo secundário anti-IgG-de-camundongo-peroxidase (*Sigma-Aldrich*) na diluição de 1:40.000 e teve sua reação enzimática medida com adição de peróxido de hidrogênio e OPD (ortofenildiamina). Os valores das absorbâncias foram

determinados a 492 nm com o uso do leitor de ELISA. Todos os testes foram realizados três vezes e os resultados expressos através da média dos valores alcançados.

3.4.3 Ensaio de neutralização *in vivo*

Com o intuito de verificar a capacidade dos anticorpos produzidos no que se refere à neutralização do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, realizou-se o ensaio de neutralização *in vivo* como descrito em Machado-de-Ávila, et al (2004). Para isso, os animais imunizados foram desafiados com a injeção subcutânea de 3,6 mg/kg de veneno de *Tityus serrulatus*, valor correspondente a duas DL-50 do veneno (Domingos, 2016). Depois de 48 horas os animais sobreviventes foram contabilizados.

4 RESULTADOS

A partir de uma análise no banco de dados do PDB, utilizando as palavras chaves “TS1” e “*Tityus serrulatus*”, encontrou-se a estrutura terciária da Ts1 depositada neste banco com o código 1NPI. A Ts1 é, então, composta por 61 aminoácidos e teve sua estrutura 3D caracterizada pela difração de raios X, apresentando o tamanho de 1.16 Å, conforme ilustra a figura abaixo:

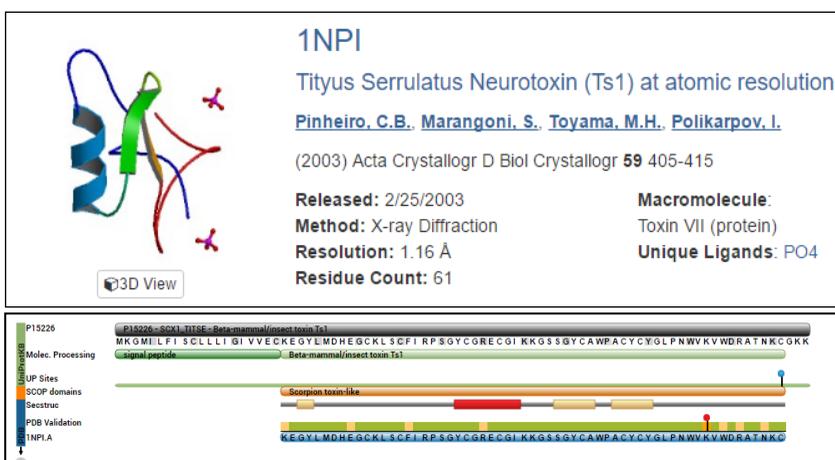


Figura 9 - Informações da Ts1 depositada sob o código 1NPI no banco de dados *Protein Data Bank*

Fonte: Adaptado de PDB

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1NPI>)

De posse da estrutura 3D da Ts1, utilizou o *software Sting Millenium* para identificar os aminoácidos destas toxinas que possuem alta probabilidade de ser um epítipo. Para isso, utilizou-se a ferramenta do *software*, o *Java protein dossier* para selecionar os resíduos de aminoácidos mais acessíveis na proteína. Assim, 19 resíduos de aminoácidos foram identificados. São eles: K1, H8, E9, F16, I17, R18, P19, S20, R25, I29, K31, Y36, W39, N49, W50, K52, R56, T58, K60. A

figura 10 apresenta os resultados obtidos pela *Java protein dossier* do *Sting millennium*.

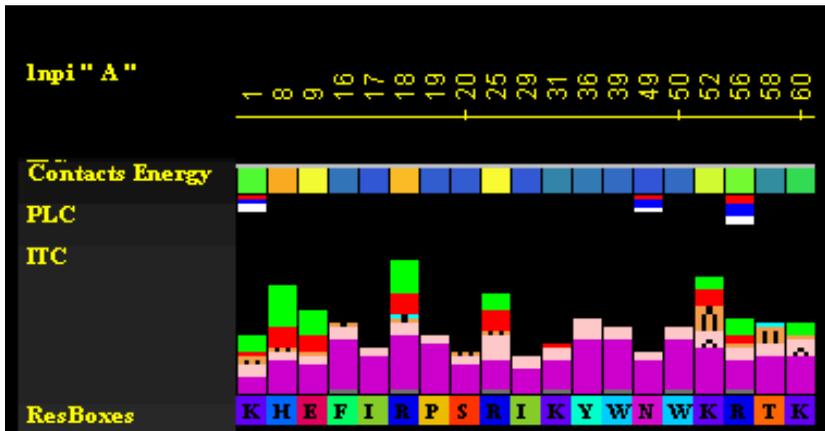


Figura 10 - Resultados da seleção dos resíduos de aminoácidos mais acessíveis na Ts1 obtidos pelo *Java protein dossier* do *Sting millennium*. Em *RexBoxes* estão os aminoácidos selecionados e acima, a posição deles na estrutura secundária. As cores são as propriedades físico-química destes aminoácidos que não foram levadas em consideração para esta análise. Fonte: Adaptado do resultado do programa *Sting Millennium*

O próximo passo foi identificar esses aminoácidos na estrutura tridimensional da Ts1 e para isso utilizou-se o *software* de visualização de estrutura proteica, o *SwissPDVWiewer*. Os aminoácidos selecionados primariamente como prováveis epítomos foram, então, coloridos na cor verde, como mostra a figura 11. Em seguida, procurou-se na estrutura uma região na proteína que continha um grande número de aminoácidos selecionados como prováveis epítomos. A determinação da região levou em consideração um diâmetro de 20 Å (tamanho médio do diâmetro de um paratopo de um anticorpo (MACHADO-DE-ÁVILA, et al 2014). Assim, a região selecionada era a que continha os seguintes aminoácidos: HIS8, GLU9, ARG25, ILE29, LYS31, ASN49, TRP50, LYS52, LYS60.

Então, em seguida, a partir da proximidade entre esses aminoácidos e seus vizinhos espaciais desenhou-se um peptídeo que mimetize a região selecionada. Os aminoácidos marcados em verde foram ligados e, quando necessário, utilizou-se os aminoácidos não selecionados (marcados em vermelho) mais próximos espacialmente para unir dois

aminoácidos em verde. Os traços na figura 11 indicam a sequência do peptídeo proposto a partir dos aminoácidos preditos (em verde) com os aminoácidos utilizados como espaçadores (em vermelho). Assim, o peptídeo proposto considerado um epítipo conformacional foi composto pela seguinte sequência de 15 aminoácidos: ARG-25, ILE-29, LYS-31, PRO-48, ASN-49, TRP-50, VAL-51, LYS-30, LYS-52, MET-6, ASP-7, GLY-10, LYS-60, GLU-9 e HIS-8.

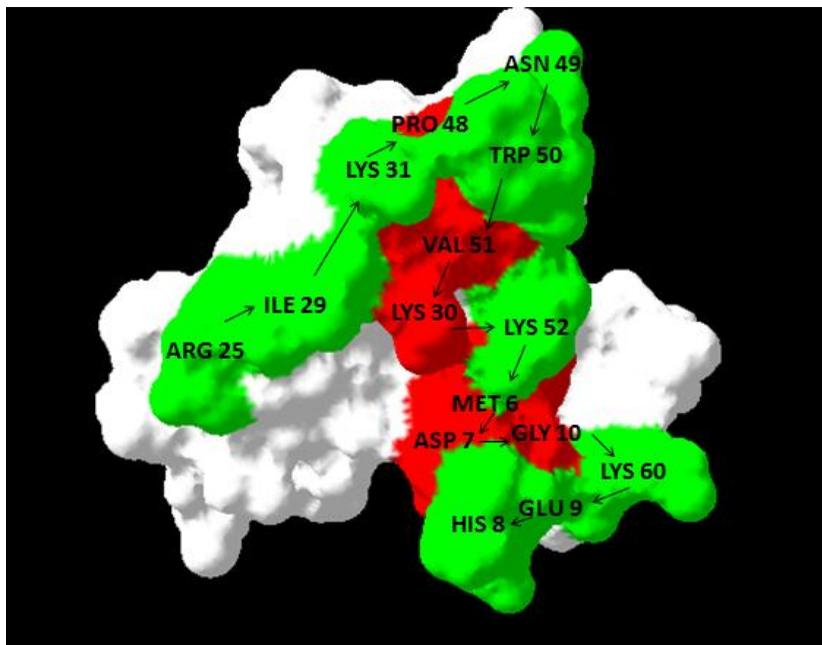


Figura 11 - Epítipo conformacional predito na Ts1.

Em verde os resíduos de aminoácidos selecionados pelo java protein dossier do programa Sting Millennium e, em vermelho, estão os resíduos de aminoácidos utilizados para a ligação dos resíduos e desenho do peptídeo. O traço mostra a forma como o peptídeo foi proposto. A estrutura 3D da Ts1 é apresentada no programa SwissPDBviewer.

Fonte: Autor

Com a sequência peptídica do epítipo conformacional definida, iniciou-se, então, a síntese do peptídeo através da técnica Fmoc conforme Merrifield (1969) e adaptada por Machado-de-Ávila et al (2011). Desta forma, 80 mg do peptídeo de sequência RIKPNWVKKMDGKEH foi obtido após a adição sequencial dos 15

aminoácidos na resina, seguido de clivagem. Este peptídeo foi, então, utilizado para produção de anticorpos em camundongos e testado sua capacidade de neutralizar o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*.

Assim, para verificar a capacidade antigênica do peptídeo, nove imunizações foram realizadas, contendo 50 µg de peptídeo com auxílio de adjuvante de Freund's, por via subcutânea em camundongos *Swiss*. Grupos controles também passaram por nove imunizações, porém com 18 µg de veneno de *Tityus serrulatus*/camundongo (controle positivo) ou 10 µg de BSA/camundongo (controle negativo). Antes da primeira imunização, foi coletado o sangue dos animais que foi centrifugado para se obter o soro pré-imune.

De posse dos soros, o próximo passo foi verificar a capacidade imunogênica do antipeptídeo produzido, a fim de comprovar a eficácia do peptídeo em mimetizar um epítipo. Para isso, ensaios de ELISA foram realizados sensibilizando as placas com veneno de *Tityus serrulatus* (figura 12) ou com o peptídeo (Figura 13). Os resultados mostraram que o antipeptídeo não foi capaz de reconhecer o veneno (figura 12). Da mesma forma que o antiveneno não foi capaz de reconhecer o peptídeo (Figura 13). Por outro lado, o peptídeo e veneno se apresentaram antigênicos, já que ambos produziram anticorpos capazes de reconhecê-los, como mostram as figura 12 e figura 13 respectivamente.

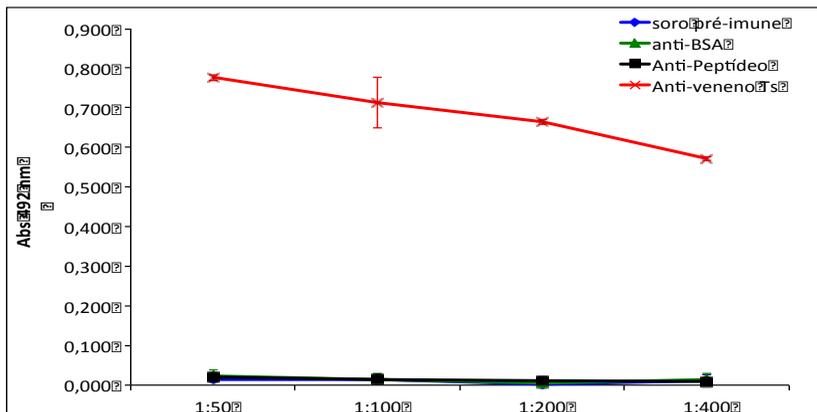


Figura 12 - ELISA Indireta da reatividade do veneno de *Tityus serrulatus* (3 µg/µL) frente aos soros antiveneno (controle positivo), anti-BSA (controle negativo), pré-imune (controle negativo) e antipeptídeo.

Utilizou-se um volume total de 100 μL por *well*. O anticorpo secundário anti-IgG-de-camundongo-peroxidase (*Sigma*) foi utilizado na diluição de 1:40.000 e teve sua reação enzimática medida com adição de peróxido de hidrogênio e OPD (ortofenildiamina). Os valores das absorvâncias foram determinados a 492 nm com o uso do leitor de ELISA. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos através da média dos valores alcançados.

Fonte: Autor

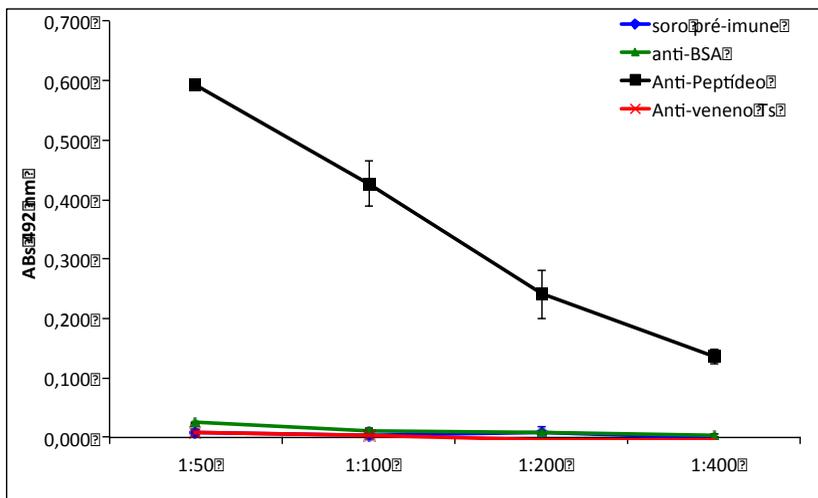


Figura 13 - ELISA Indireta da reatividade do peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) frente aos soros antiveneno (controle positivo), anti-BSA (controle negativo), pré-imune (controle negativo) e anti-peptídeo.

Utilizou-se um volume total de 100 μL por *well*. O anticorpo secundário anti-IgG-de-camundongo-peroxidase (*Sigma*) foi utilizado na diluição de 1:40.000 e teve sua reação enzimática medida com adição de peróxido de hidrogênio e OPD (ortofenildiamina). Os valores das absorvâncias foram determinados a 492 nm com o uso do leitor de ELISA. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos através da média dos valores alcançados.

Fonte: Autor

Por fim, para confirmar se o grupo imunizado com o peptídeo é capaz de neutralizar o veneno, os animais imunizados nos quatros grupos foram desafiados com a injeção correspondentes às duas DL-50 do veneno, a Tabela 3 contém o resultado deste ensaio.

Tabela 3 – Resultados da Neutralização *in vivo*.

| Grupos imunizados | Número de sobreviventes | % de animais que tiveram o veneno neutralizado |
|--|--------------------------------|---|
| Grupo PBS (controle negativo) | 0/4 | 0 % |
| Grupo Veneno <i>Tityus serrulatus</i> (controle positivo) | 4/4 | 100 % |
| Grupo peptídeo | 3/4 | 75% |

Animais imunizados com BSA (grupo controle negativo), veneno de *Tityus serrulatus* (controle positivo) e peptídeo, foram desafiados com a injeção subcutânea no valor correspondente a duas DL-50 (3,6mg/kg) e foi contabilizado o número de sobrevivente após 48 horas.

Fonte: Autor

Os resultados mostram que o grupo imunizado com o peptídeo foi capaz de neutralizar parcialmente a ação do veneno (75% dos casos), enquanto que, no grupo imunizado com BSA, todos os animais vieram a óbito e no grupo imunizado com veneno todos os animais tiveram o veneno neutralizado.

5 DISCUSSÃO

O envenenamento causado por escorpiões constitui um problema de saúde pública mundialmente importante. Anualmente, estima-se que o número de acidentes ultrapasse a faixa de 1 milhão de casos por ano, dos quais entre 50 e 75% requerem tratamento para prevenir a morte, amputações ou sequelas permanentes (Brasil, 2009). A metodologia atual para produção de um soro antiescorpiônico abrange questões bioéticas, principalmente, porque este processo reduz o tempo e a qualidade de vida dos animais envolvidos na produção. Além disso, o alto custo financeiro para a criação de equinos, manutenção e criação de escorpiões, local apropriado para produção, e mão-de-obra especializada são outros fatores que indicam que uma nova metodologia se faz necessária. (Gazarian, et al, 2005; Chippaux et al, 2007; Domingos, 2016).

O soro antiescorpiônico no Brasil é produzido através da aplicação do veneno *Tityus serrulatus* em equinos. Este animal recebe altas doses de veneno, o que reduz a sua qualidade de vida, já que ele sofre com os sintomas do envenenamento. Esta é uma metodologia antiga, proposta por Calmette (1894) e, desde, então sofreu poucas alterações. Além disso a média de vida de 25 anos destes animais passa para 4 anos, gerando uma série de discussões sobre questões bioéticas. (Calmette, 1894; Gazarian, et al, 2005; Chippaux et al, 2008; Domingos, 2016).

Assim, para resolver essa problemática, bem como o custo de produção, vários estudos buscam o desenvolvimento de um novo antígeno que não seja tóxico, para que possa substituir o uso do veneno como imunógeno sem perder a capacidade de produzir anticorpos neutralizantes para o veneno. Estes trabalhos visam encontrar nas toxinas do veneno a parte responsável por induzir a resposta imunológica, ou seja, o epítipo desta toxina (Machado-de-Ávila et al, 2004; Felicori et al, 2005; Ferreira et al, 2006; Gomes et al, 2008; Duarte et al, 2010; Duarte et al, 2011; Machado-de-Ávila et al, 2011; Schneider et al, 2012; Mendes et al, 2013; Schneider et al, 2014; Figueiredo et al, 2014; Machado-de-Ávila et al, 2014; Ramos et al, 2016). Da mesma forma, neste trabalho encontrou-se um epítipo conformacional da Ts1 e sintetizou-se um peptídeo a partir dos aminoácidos selecionados.

A Ts1 é a principal toxina do veneno escorpião *Tityus serrulatus*, uma β -toxina que representa cerca de 15% do seu peso solúvel (Pessini et al, 2007). Além disso, a Ts1 apresenta alta similaridade na sua estrutura primária com outras toxinas do veneno (Ts2, Ts3 e Ts4) (Machado-de-

Ávila et al, 2004). Estes fatos explicam o motivo da escolha da Ts1 como toxina molde para predição do epítopo. Ao predizer um epítopo conformacional e sintetizar um peptídeo, a partir dos aminoácidos preditos capazes de mimetizar o epítopo da Ts1, conseqüentemente, obtêm-se uma molécula que pode ser capaz de neutralizar o veneno escorpiónico.

Os dados encontrados no PDB mostram que a Ts1 é composta por 61 aminoácidos (Pinheiro et al, 2003). Alguns trabalhos mostram que o tamanho das toxinas escorpiónicas giram em torno de 60 a 70 aminoácidos. Normalmente, são moléculas com 3 folhas-betas e uma alfa-hélice, formadas por 4 pontes de dissulfetos. Assim, estes autores creditam a esta composição estrutural a reponsabilidade em se ligar ao canal para Na^+ (Becerril et al, 1997). Por outro lado, o peptídeo predito neste trabalho apresenta apenas 15 aminoácidos e uma ponte de dissulfeto. Assim, é presumível que este fator explique a não toxicidade do peptídeo, já que este não interage com os canais iônicos e, desta forma, não apresenta o efeito tóxico. Todavia, um peptídeo de 15 aminoácidos é capaz de gerar boa resposta imune, como relata Kozlova et al (2015), em que alguns epítomos com poucos aminoácidos são responsáveis por ativar uma resposta imune.

É importante frisar que, no desenho de um peptídeo que mimetize um epítopo, o ideal é que ele possua cerca de 10 a 20 aminoácidos, não ficando muito abaixo ou acima dessa quantidade. Isso porque se o peptídeo for muito curto, os anticorpos produzidos a partir dele poderão reconhecer diversas proteínas que possuam sequências de aminoácidos parecidas, perdendo assim a especificidade do anticorpo. Do contrário, se for muito longo, os anticorpos produzidos podem ter dificuldade de reconhecer o local de ligação da região mimetizada, já que o peptídeo começara a adquirir uma estrutura secundária e deixará de ser flexível (Chen et al, 2016). Estudos que avaliaram a interação antígeno-anticorpo através da cristalografia de raio-X demonstraram que o sítio de interação entre o epítopo e o paratopo possui cerca de 10 a 20 aminoácidos (Amit et al, 1985; Amit et al, 1986), confirmando a importância do tamanho do epítopo para uma reação imune efetiva.

Como a conformação da Ts1 parece ser importante para interação com o canal, faz-se indicar que um epítopo para Ts1 deva ser conformacional e não linear. Este fato vai de encontro ao relatado por Van Regenmortel (1996) que afirma que os epítomos para que promovem uma reação imune são na maioria das vezes conformacionais. Somado a isso, a predição de epítomos conformacionais através da bioinformática é um método que, possivelmente, substituirá a atual forma de produção de

antiveneno, que apresenta alto custo de produção e questões bioéticas envolvidas. Estudos demonstram que anticorpos que se ligam a epítomos conformacionais possuem maior poder neutralizante sobre a toxicidade do veneno, já que esses anticorpos são mais específicos a neutralizar o efeito tóxico do veneno (Devaux et al, 1997; Alvarenga et al, 2005; Loret et al, 1992).

Para fazer a predição do epítomo, precisou-se antes obter a estrutura 3D da Ts1. Foi visto que no PDB existem dois depósitos referente a Ts1. Ambas moléculas depositadas no PDB tiveram sua estrutura 3D identificada por cristalografia de raio-X, e a diferença entre elas está apenas na resolução da estrutura, sendo a de código 1NPI a que possui menor tamanho da resolução. Rhodes (2006) afirma que quanto menor o tamanho da resolução de um cristal, melhor a definição da estrutura 3D cristalografada e, por este motivo, utilizou-se, neste trabalho, a proteína 1NPI.

De posse da estrutura 3D da Ts1, o próximo passo foi prever o epítomo conformacional. Sabe-se que um epítomo possui algumas características fundamentais para sua funcionalidade. Além do seu tamanho, as qualidades mais importantes são a hidrofobicidade, acessibilidade e sua flexibilidade (Machado-de-Ávila et al, 2014). Kozlova et al (2015) destacam ainda que os aminoácidos que possuam essas propriedades (como acessibilidade ao solvente, serem hidrofílicos ou mesmo aqueles aminoácidos considerados conservados por estarem sempre presentes em epítomos) não possuem significância sozinhos, porém podem adquirir importância quando utilizados em conjunto com outros aminoácidos. Portanto, neste trabalho, utilizou-se a acessibilidade ao solvente para a seleção dos aminoácidos mais favoráveis à ligação antigênica. Esta escolha se baseou na definição de um epítomo feita por Van Regenmortel (1996), em que um epítomo é a região de um antígeno capaz de se ligar em um paratopo de um anticorpo induzindo uma resposta imune. Assim, como o epítomo tem que se ligar ao paratopo dos anticorpos, consequentemente, ele tem que estar acessível na proteína. Desta forma, os aminoácidos selecionados pelo programa *STING Millennium* e mostrados na figura 10 e em verde na figura 11 são os mais acessíveis da Ts1.

O desenho do peptídeo, ilustrado na figura 11, foi realizado a partir da definição da região da proteína Ts1 que mais continha os aminoácidos selecionados. O tamanho desta região não poderia passar de 20Å de diâmetro. Este diâmetro máximo se deve ao fato de ser o tamanho médio de um paratopo, como decorevem Machado-de-Ávila (2011), Assis (2013) e Machado-de-Ávila et al (2014). Dessa forma, o epítomo predito

tinha que apresentar um diâmetro de no máximo 20Å entre sua porção C e N-Terminal. Então, o peptídeo foi desenhado, ligando os aminoácidos selecionados dentro deste diâmetro. Os aminoácidos foram ligados de acordo com a distância espacial entre eles, ou seja, um aminoácido selecionado ligou no aminoácido vizinho mais próximo. Quando entre dois aminoácidos selecionados existia espacialmente um aminoácido não selecionado, este aminoácido era utilizado como ligante (figura 11, cor vermelha). Machado-de-Ávila et al (2014) utilizou de uma metodologia parecida para desenhar um epítipo conformacional para a Mutalisina II, uma metaloproteínase do veneno da serpente *Lachesis muta muta* (surucucu). Neste trabalho, eles viram que o epítipo conformacional desenhado foi capaz de neutralizar o efeito hemorrágico do veneno. Eles ainda afirmam que os aminoácidos utilizados como ligantes, mesmo não estando acessíveis na proteína, são importantes para o desenho do peptídeo, já que exercem um papel de deixar o peptídeo com as mesmas propriedades físico-química e conformacional da região epitópica (Machado-de-Ávila, 2011). Assim, da mesma forma neste trabalho, o peptídeo predito na Ts1, de sequência RIKPNWVKKMDGKEH, possui as mesmas propriedades físico-química e conformacional da região selecionada na Ts1.

O peptídeo, predito e sintetizado, é formado pelos aminoácidos ARG-25, ILE-29, LYS-31, PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51, LYS-30, LYS-52, MET-6, ASP-7, GLY-10, LYS-60, GLU-9 e HIS-8. Estes aminoácidos estão bem distribuídos na estrutura primária da proteína, já que são encontrados na porção N-terminal (MET-6, ASP-7, HIS-8, GLU-9 e GLY-10), central (ARG-25, ILE-29, LYS-30 e LYS-31) e C-terminal (PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51 e LYS-52 e LYS-60). No entanto, estão todos bem próximos espacialmente em uma mesma região na proteína.

Machado-de-Ávila et al (2004) viram em seu trabalho a presença de um epítipo linear na porção C-terminal da proteína formado pelos aminoácidos (LEU-47, PRO-48, ASN-49, TRP-50, VAL-51, LYS-52, VAL-53, TRP-54, ASP-55, ARG-56, ALA-57, THR-58, ASN-59, LYS-60 e CYS-61) capaz de ser reconhecido por um anticorpo policlonal anti-TsTFG50 (Fração tóxica do veneno *Tityus serrulatus* purificada em coluna Sephadex G-50). Interessantemente, os seis aminoácidos preditos na porção C-terminal (PRO-48, ASN-49, TPR-50, VAL-51 e LYS-52 e LYS-60) do nosso peptídeo aparecem no peptídeo de Machado-de-Ávila, et al, 2004. Este fato reforça o caráter de epítipo do peptídeo exposto aqui e ainda indica que o peptídeo predito por Machado-de-

Ávila et al (2004) poderia, na verdade, ser parte de um epítopo conformacional.

Esta hipótese é reforçada, pois, no mesmo trabalho, Machado-de-Ávila et al (2004), ao estudar outras duas toxinas do veneno, a Ts2 (uma outra β -toxina) e a Ts3 (principal alfa-toxina do veneno) encontraram dois epítopos lineares para cada toxina. Um na região C-terminal da toxina e outro na região central da toxina, a mesma região central (ARG-25, ILE-29, LYS-30 e LYS-31) do epítopo conformacional predito exposto aqui. Assim, além de reforçar a ideia dos epítopos de Machado-de-Ávila et al (2004) serem na verdade conformacionais ao invés de lineares, fazem supor que como os autores daquele estudo mostraram que os aminoácidos da porção C-terminal e central eram importantes para reconhecer e neutralizar outras toxinas do veneno *Tityus serrulatus*, o epítopo conformacional abordado também seria, ou seja, com estas informações, pode-se supor que o peptídeo seja capaz de reconhecer e gerar anticorpos neutralizantes para as principais toxinas do veneno Ts.

A importância da região central na Ts1 é ainda relatada no trabalho de Alvarenga et al (2005), onde viram a interação dessa região, mais especificamente o epítopo linear formado pelos aminoácidos LYS-30, LYS-31, GLY-32, SER-33, SER34, GLY-35, TYR-36, SER-37, ALA-38, TRP-39, PRO-40, ALA41, SER-42, TYR-43, SER-44 com um anticorpo monoclonal anti-TsTFG50. Os cinco aminoácidos da região central do peptídeo (ARG-25, ILE-29, LYS-30 e LYS-31) fazem parte do epítopo linear encontrado no trabalho de Alvarenga et al (2005). Mais uma vez, estes dados mostram que o epítopo conformacional abordado é bastante reativo e capaz de interagir com as toxinas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Alvarenga et al (2005) relataram ainda que ao realizarem o ensaio de ALASCAN, no qual sintetizaram, em um membrana de celulose, o peptídeo várias vezes, trocando em cada síntese um dos aminoácidos do epítopo linear por uma alanina, foi verificado que a LYS-30 e a LYS-31 são responsáveis pela ligação do epítopo com o anticorpo monoclonal anti-TsTFG50, já que, nos dois peptídeos em que a LYS-30 ou LYS-31, foram substituídas por uma alanina, o peptídeo não apresentou reatividade com o anticorpo monoclonal. O peptídeo proposto contém esses dois aminoácidos, então, indicando, mais uma vez, que é um epítopo conformacional e que a nossa predição foi capaz de encontrar os resíduos chaves para interação com o anticorpo.

Já Cohen et al (2005) relatam a importância de um domínio que ele atribui como sendo o domínio farmacoporo da Ts1 e de todas as β -

toxinas. Este domínio é formado pela região central e N-terminal da toxina. Como o epítipo predito contém essas duas regiões, os anticorpos produzidos contra eles seriam capazes de se ligar nessa região da Ts1 e, assim, bloquear o efeito tóxico das β -toxinas deste veneno.

Em outro estudo, Devaux et al, 1993 mostram a importância das mesmas regiões C-terminal, central e N-terminal previstas no nosso trabalho para as β -toxinas escorpiônicas. Além disso, identificaram o aminoácido LYS-30 em uma das sequências de maior reação antigênica. Eles, ao estudarem a AaH-2, principal β -toxina do veneno do escorpião *Androctonus australis Hector* e com alta similaridade com a Ts1, viram que estas três regiões eram reconhecidas por anticorpos anti-AaH-2 produzidos em coelhos, mostrando então serem as mesmas regiões antigênicas vistas no nosso trabalho. Vale destacar que, neste trabalho, eles mostram também a importância da região N-terminal para ligação com o anticorpo. Mesma região que completa a sequência do epítipo conformacional predito. Assim como o peptídeo predito é formado pela junção das três principais regiões da proteína que são sempre reconhecidas como epítipo linear, pode-se presumir que o epítipo, além de conformacional, seja capaz de ser reconhecido por qualquer anticorpo anti-Ts1.

Após as análises *in silico* comprovarem que o peptídeo desenhado era um epítipo conformacional, o próximo passo foi realizar as análises *in vivo* e *in vitro* para validar esses resultados, ou seja, verificar se esse peptídeo realmente exercia, *in vivo*, a função de um epítipo conformacional. Então, após a síntese química do peptídeo de sequência RIKPNWVKKMDGKEH, camundongos *Swiss* foram imunizados para obtenção de anticorpos antipeptídeo. Como controle positivo, utilizou-se o veneno de *Tityus serrulatus* para obtenção de anticorpos antiveneno e, como controle negativo, utilizou-se uma proteína inerte, o BSA para obtenção de anticorpos anti-BSA. As imunizações foram adaptadas para camundongos, mas continuaram a seguir a metodologia preconizada pelo Ministério da Saúde para obtenção do soro antiescorpiônico comercial. Em estudos realizados por Mendes (2012) e Assis (2013), nos quais utilizou-se peptídeos imunogênicos, foi visto que o modelo murino pode ser capaz de substituir o modelo com animais de grande porte, apresentando excelentes respostas imunológicas.

A definição das doses de antígenos utilizadas em cada grupo baseou-se no estudo de Machado-de-Ávila et al (2011). O grupo controle positivo que teve como antígeno o veneno de *Tityus serrulatus*, recebeu 0,018mg de veneno por camundongo. Esta dose equivale a 0,45 mg/kg, ou seja, $\frac{1}{4}$ da DL-50 do veneno. A definição deste valor se deve ao fato

de ser uma dose capaz de gerar uma resposta imune, sem matar os animais imunizados. No grupo que recebeu como antígeno o peptídeo, a dose foi 0,050mg por camundongo que equivale à 2,5 mg/kg e é, aproximadamente, 2,8 vezes maior que a dose utilizada no grupo controle positivo. A diferença dos valores imunizados do grupo peptídeo com o grupo controle positivo se deve à massa e ao tamanho das moléculas. O peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH é, aproximadamente, 2,8 vezes menor que o veneno, já que o peptídeo possui uma massa molecular de 1.866 Da, enquanto que o veneno, apesar de ser composto por várias moléculas diferentes, as que possuem um efeito tóxico, são proteínas de baixo peso que variam entre 3.500 à 7.000 Da (média de 5.250 Da) (MACHADO-DE-ÁVILA et al, 2004; COLOGNA et al, 2009). Da mesma forma, no controle negativo, que utilizou o BSA como antígeno, a dose de 0,0014 mg por camundongo, equivalente a 0,07 mg/kg, foi definida com base na relação do tamanho e massa molecular do BSA. Como o BSA possui uma massa molecular de 66.500 Da, ou seja, aproximadamente 35,6 vezes maior que a massa do peptídeo, a dose definida em mg/kg foi 35,6 vezes menor que a do peptídeo. Vale destacar, que esta dose está padronizada, como mostra o trabalho de Machado-de-Ávila et al, 2004, que verificaram a capacidade neutralizante da TsTF50 associada ao BSA a partir de 9 imunizações em camundongos Balb/C e Black-C57 e utilizando a mesma dose de BSA utilizada neste trabalho como controle (Machado-de-Ávila et al, 2004). As imunizações ocorreram com auxílio do adjuvante de *Freund's*. Este adjuvante, apesar de poder provocar pequenas lesões nos animais imunizados, tem como vantagem a capacidade de ativar rapidamente o sistema imune. (Duarte 2007; Mendes 2012).

Após as imunizações, os animais tiveram seu sangue coletado e o soro com anticorpos obtidos. Como controle da produção de anticorpos, antes da primeira imunização, os mesmos animais também tiveram o seu sangue coletado para obtenção do soro (soro pré-imune). O peptídeo para ser considerado um epítipo conformacional deve apresentar respostas antigênica e imunogênica (Van Regenmortel, 1996). A resposta antigênica é definida como aquela capaz de induzir a produção de anticorpos, já a resposta imunogênica aquela capaz de gerar uma resposta imunológica (Abbas, Lichtman, Pillai, 2015). Assim, para confirmação da capacidade do peptídeo em produzir anticorpos, ou seja, sua capacidade antigênica, realizou-se o ensaio de ELISA indireto.

O teste de ELISA apresenta sucesso em diversos estudos envolvendo a produção de antivenenos. Duarte (2007) confirmou a produção de anticorpos contra toxinas escorpiônicas através deste método. Da mesma

forma, Machado-de-Ávila et al, 2004 verificaram a capacidade antigênica da TsTFG50 associada ao BSA, utilizando a mesma metodologia. Koslova em 2016 também utilizou protocolo similar, verificando a capacidade antigênica de peptídeos de uma serpente brasileira, *Crotalus durissus*.

Os resultados da ELISA, apresentados na figura 13, mostraram que o peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH foi capaz de gerar anticorpos, comprovando, assim, sua capacidade antigênica. Nesta ELISA, a placa foi sensibilizada com o peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH. Assim como esperado, os controles negativos (anticorpos anti-BSA e pré-imune) não apresentaram reatividade com o peptídeo. Já em relação ao anticorpo antiveneno que poderia apresentar reatividade com o peptídeo, os resultados mostraram que ele também não foi reativo. Essa ausência de reatividade do anticorpo antiveneno com o peptídeo pode ser atribuída à complexidade do veneno. É importante enfatizar que o veneno do *Tityus serrulatus* é uma mistura complexa de proteínas básicas, peptídeos, carboidratos e outros componentes, e, assim, todas essas moléculas funcionam no organismo do animal imunizado como antígenos, gerando anticorpos contra todos eles. (Simard; Watt 1990). Portanto, o anticorpo antiveneno é uma mistura de anticorpos contra diversas moléculas. Dentre essas moléculas, está a Ts1, que gerará alguns anticorpos contra ela e dentre esses anticorpos está aquele capaz de realizar o efeito neutralizante. Então, acredita-se que o antiveneno não foi capaz de reconhecer o peptídeo devido aos anticorpos específicos estarem diluídos no antiveneno. Uma hipótese para confirmar essa suposição seria purificar o antiveneno em coluna de afinidade para obtenção apenas dos anticorpos específicos que ligam ao peptídeo.

Da mesma forma, os resultados da ELISA apresentados na figura 12 mostram que o anti-peptídeo não foi capaz de reconhecer o veneno de *Tityus serrulatus*, utilizado para sensibilizar a placa de ELISA. Este resultado pode ser explicado pelo mesmo motivo relatado no parágrafo anterior. Como o veneno apresenta diversas moléculas na sua composição, o epítipo da Ts1 estava diluído entre essas moléculas, e havia, assim, poucos epítipos na placa e conseqüentemente pouco anticorpo se ligou a ele. Neste caso, uma hipótese para confirmar essa suposição seria purificar o veneno afim de obter apenas a toxina Ts1 e utilizando esta toxina para sensibilizar a placa. No entanto, como não era este o enfoque do trabalho e como será discutida mais à frente, os resultados da tabela 2 mostraram que o peptídeo gerou anticorpos

capazes de neutralizar o veneno de *Tityus serrulatus*. Logo, o peptídeo é capaz de gerar anticorpos que neutralizam o veneno.

A partir do resultado do ELISA que demonstrou que o peptídeo é antigênico, o próximo passo foi verificar através da neutralização *in vivo* se este era imunogênico, ou seja, pelo teste de ELISA, verificou-se que o peptídeo desenhado por bioinformática a partir de uma previsão *in silico* de um epítopo conformacional era capaz de gerar anticorpos.

Destes anticorpos gerados era necessário ainda, verificar se seriam capazes de provocar uma resposta imunológica, no caso, neutralizar a ação do veneno. Para isso, os camundongos que foram imunizados receberam uma injeção de *Tityus serrulatus* na dose 3,6mg/kg, valor correspondente a duas DL-50 do veneno, ou seja, capaz de matar todos os animais. A tabela 2 mostra que todos os animais que foram imunizados com veneno de *Tityus serrulatus* sobreviveram ao envenenamento, enquanto que os animais que receberam BSA durante as imunizações foram a óbito. Estes dados estão de acordo com o esperado. Como os animais que receberam o veneno durante as imunizações estavam com alta quantidade de anticorpos antiveneno circulantes, esses anticorpos neutralizaram o veneno, impedindo, assim, que levassem os animais ao óbito. Já os animais que receberam BSA durante as imunizações, estavam apenas com anticorpos anti-BSA circulantes que não são capazes de neutralizar a ação do veneno.

Maria et al (2005) mostraram em um estudo com anticorpos antiveneno bruto de *Tityus serrulatus* produzidos em cavalos que eles são capazes de neutralizar a ação do veneno. Os mesmos autores afirmam que estes anticorpos reconhecem, principalmente, alguns aminoácidos das regiões N-terminal, central e C-terminal das toxinas dos venenos. E apesar de peptídeos formados a partir de epítotos lineares serem capazes de gerar anticorpos neutralizantes sobre o efeito tóxico do veneno, os anticorpos mais potentes na neutralização destes efeitos devem ser formados por regiões conformacionais (Maria et al, 2005).

O peptídeo desenhado, sintetizado e utilizado como imunógeno neste trabalho, é formado por aminoácidos presentes nestas três regiões ditas por Maria et al, (2005) e como mostra a tabela 2, ele foi capaz de neutralizar a ação tóxica do veneno em 75% dos animais que receberam o veneno. Ou seja, mesmo sendo formado por uma pequena parte de apenas uma toxina do veneno do escorpião, ele foi capaz de neutralizar em 75% dos casos o efeito tóxico de todo o veneno. Espera-se ainda que um pequeno ajuste, como a quantidade de peptídeo ou a quantidade de

imunizações, no protocolo de imunização, seja capaz de elevar este número para 100%.

Nesta linha, Duarte et al (2011) viram que um peptídeo formado por dois epítomos lineares, um da região C-terminal e outro da região N-terminal da Ts3 do veneno de *Tityus serrulatus* foram capazes de gerar anticorpos capazes de neutralizar em 50% dos casos, o valor de 2,8 vezes a DL-50 do veneno escorpiónico. A Ts1 possui 65% de similaridade com a Ts3, 65% de similaridade com a Ts4 e 72% de similaridade com a Ts2 (Mendes et al, 2008). Esta alta porcentagem ajuda a explicar os motivos pelo quais o anti-peptídeo é capaz de neutralizar o veneno. As toxinas que compõem o veneno são basicamente formadas por neurotoxinas que agem nos canais de Na⁺, possuindo todas as estruturas terciárias parecidas, formadas por uma alfa-hélice, três folhas betas-pregueadas e quatro ligações de dissulfetos. (Machado-de-Ávila et al, 2004; Alvarenga et al, 2005; Duarte 2011; Mendes, 2012). Como entre 65 a 72% dos aminoácidos destas neurotoxinas são conservados, pode-se extrapolar que um anticorpo que reconhece e neutraliza a toxicidade de uma destas toxinas, como elas são bem semelhantes, irá reconhecer e neutralizar a toxicidade de todas as outras toxinas do veneno. Assim, o peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH, predito e desenhado por bioinformática como sendo um epítomo conformacional da Ts1, se mostrou capaz de gerar anticorpos neutralizantes do efeito tóxico do veneno, tornando-se, assim, um potencial antígeno para substituir o veneno nas imunizações de preparo dos soros antiescorpiónico.

6 CONCLUSÃO

Em vista dos argumentos apresentados, o peptídeo RIKPNWVKKMDGKEH predito e desenhado por bioinformática é um epítipo conformacional e este peptídeo, quando sintetizado e utilizado como imunógeno, foi capaz de gerar anticorpos capazes de neutralizar o efeito do veneno *Tityus serrulatus*.

REFERÊNCIAS

Abbas, AK, Lichtman, AH. Pillai S. Antibodies and antigens. In: ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. eds. Cellular and Molecular Immunology. 8ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015.

Albuquerque CMR, Porto TJ, Amorim MLP, Neto PLS. Escorpionismo por *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones; Buthidae) no Estado de Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(2):206-208.

Almeida A. Antígenos [monografia]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2002.

Alvarenga LM, Machado-de-Avila RA, Amim PR, Martins MS, Kalapothakis E, de Lima ME, Santos RG, Granier C, Chávez-Olórtegui C. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon. 2005;46(6):664-671.

Araújo ND, Farias RP, Pereira PB, Figueirêdo FM, Morais AMB, Saldanha LC, Gabriel JE. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. Estud Biol. 2008;30(70-72):143-148.

Armanda-da-Silva P, Alves F. Efeitos da ingestão dos aminoácidos de cadeia ramificada na fadiga central. Rev Port Ciênc Desporto. 2009;5(1):102-113.

Assis LM. Predição de epitopos de célula B em proteínas de *Leishmania infantum*: uma análise in silico [tese de doutorado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2013.

Barhanin J, Ildefonse M, Rougier O, Sampaio SV, Giglio JR, Lazdunski M. *Tityus* gamma toxin, a high affinity effector of the Na⁺ channel in muscle, with a selectivity for channels in the surface membrane. Pflügers Archiv. 1984;400(1):22-27.

Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. 1997;35(6):821-835.

Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol*. 2003;10(12):980.

Billen B, Bosmans F, Tytgat J. Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Curr Pharm Des*. 2008;14(24):2492-2501.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-29.

Bosmans F, Tytgat J. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltagegated Na⁺ channels. *Toxicon*. 2007;49(4):550-560.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle de escorpiões. Brasília, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Animais peçonhentos e venenosos. Brasília: Ministério da Saúde/Fiocruz, 2015b.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, 2015. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 03 set. 2015a.

Calmette A. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents et la thrapeutique expdrimentale des morsures venimeuses. *C R Acad Sci*. 1894:118(720).

Cardoso CFL, Soares MA. Animais peçonhentos do município de Mangaratiba, RJ. *Rev. Elt. Novo Enfoque*, v. 16, n.16, p. 25-40, 2013.

Cardoso JLC, Fan, HW. Introdução ao ofidismo. In: Cardoso, JLC et al (org.). *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 6-21.

Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. Voltage gated ion channels and gating mo difier toxins. *Toxicon*. 2007;49(2):124-141.

- Cerni, FA. Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2012.
- Cestèle S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochemie*. 2000;82(9-10):883-892.
- Chippaux JP, Goyffon, M. Epidemiology of scorpionismo: A global appraisal. *Acta Tropica*. 2008;107(2):71-79.
- Chippaux JP. Epidemiological investigation on envenomation: from theory to practice. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(4):446-450.
- Cohen L, Karbat I, Gilles N, Ilan N, Benveniste M, Gordon D, Gurevitz M. Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem*. 2005;280(6):5045-5053.
- Cologna CT, Marcussi S, Giglio JR, Soares AM, Arantes EC. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein Pept Lett*. 2009;16(8):920-932.
- Cologna CT, Peigneur S, Rosa JC, Selistre-de-Araujo HS, Varanda WA, Tytgat J, Arantes EC. Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2011;58(1):54-61.
- Cologna CT. Isolamento e caracterização estrutural e funcional da Ts15, uma nova neurotoxina da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
- Cupo P, Azevedo MM, Hering SE. Acidentes por animais peçonhentos: Escorpiões e aranhas. *Medicina*. 2003;36:490-497.
- Cupo P, Hering SE. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2002;40(6):823-30.
- Devaux C, Moreau E, Goyffon M, Rochat H, Billiard P. Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that

neutralizes toxin AahI from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. Eur J Biochem. 1997;268(3):694-702.

Devaux C, Clot-Faybesse O, Juin M, Mabrouk K, Sabatier JM, Rochat H. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. FEBS Lett. 1997;4(412):456-60.

Dhawan R, Joseph S, Sethi A, Lala AK. Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion *Buthus thalampus*. FEBS Lett. 2002;528(1-3):261-266.

Dias MB, Campolina DE, Guerra COM, Guerra, DE, Andrade Filho A. Escorpionismo In: Andrade Filho A. Toxicologia na prática clínica. Folium, Belo Horizonte; 2001. p. 155-165.

Diniz CR. Chemical and pharmacological aspects of *Tityinae* venom. In: Bettini S. editors. Arthropod Venoms. Berlin: Springer-Verlag, Berlin, 1978. p. 379-394.

Diniz JS. Bula com informações ao paciente: soro antiescorpiônico. Belo Horizonte: FUNED – Fundação Ezequiel Dias, 2017. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=1233402015&pIdAnexo=2447866> Acesso em: 20 jan. 2017.

Domingos AC. Caracterização Imunoquímica E Genotóxica Do Veneno Do Escorpião *Tityus serrulatus* [dissertação de mestrado]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2016.

Duarte CG. Identificação, síntese e caracterização de um epitopo descontínuo da TsNTxP: uma anatoxina natural do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Duarte CG, Alvarenga LM, Dias-Lopes C, Machado-de-Avila RA, Nguyen C, Molina F, Granier C, Chávez-Olórtegui C. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. Vaccine. 2010;28(20):1168–1176.

Duarte CG. Imunoquímica de toxinas escorpiônicas que afetam canais para sódio: mapeamento de epitopos descontínuos [tese de doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.

Duarte KF, Junqueira OM, Filardi RS, Siqueira JC, Garcia EA, Laurentiz AC. Exigência em treonina para frangos de corte de 22 a 44 dias de idade. *Rev Bras Zootec.* 2012;41(1):72-79.

Edwards AM, Zhang K, Nordgren CE, Blasie JK. Heme structure and orientation in single monolayers of cytochrome c on polar and nonpolar soft surfaces. *Biophys J.* 2000;79(6):3105-3117.

Felicoria L, Araujo SC, Machado-de-Ávila RA, Sanchez EF, Granier C, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon.* 2006;48(5):509-519.

Fernandez JH, Neshich G. Utilização de alinhamento estrutural de proteínas no estudo de interface Forming Residues de Proteína-quinases com inibidores. Comunicado Técnico Embrapa, Campinas, ISSN 1677-8464, dez. 2002.

Fernandes, ICM. Aminoácidos em solução aquosa contendo electrólitos [dissertação de mestrado]. Bragança: Instituto Politécnico Escola Superior em Tecnologia de Bragança em Gestão; 2008.

Ferreira RB, Franzini VP, Gomes Neto, JA. Determinação de bireto em ureia agroindustrial por espectrofotometria. *Eclét Quím.* 2006;32(1):43-48.

Gazarian KG, Gazarian T, Hernández R, Possani LD. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine.* 2005;23(26):3357–3368.

Gomes PC, Machado-de-Ávila RA, Selena Maria W, Richardson M, Fortes-Dias CL, Chávez-Olórtegui C. The co-purification of a lectin (BJcuL) with phospholipases A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom by immunoaffinity chromatography with antibodies to crotoxin. *Toxicon.* 2007;49(8):1099-1108.

- Guimaraes PTC, Pinto MCL, Melo MM. Perfis clínico e hematológico de camundongos submetidos ao envenenamento escorpiano experimental por *Tityus fasciolatus*. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011;63(6):1382-1390.
- Gurevitz M, Karbat I, Cohen L, Ilan N, Kahn R, Turkov M, Stankiewicz M, Stühmer W, Dong K, Gordon D. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. Toxicon. 2007;49(4):473-489.
- Hassani O, Mansuelle P, Cestele S, Bourdeaux M, Rochat H, Sampieri F. Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts gamma) from the scorpion *Tityus serrulatus*. Eur J Biochem. 1999; 260(1):76-86.
- Harmening DM. Técnicas moderna em banco de sangue e transfusão. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2002.
- Hewer R, Meyer D. Peptide immunogens based on the envelope region of HIV-1 are recognized by HIV/AIDS patient polyclonal antibodies and induce strong humoral immune responses in mice and rabbits. Mol Immunol. 2003; 40(6): 327-335.
- Huang J, Honda WC. A conformational epitope database. BMC immunol. 2006; 7(7):7.
- Huang R, Han L, Li J, Liu S, Shao K, Kuang Y, Hu X, Wang X, Lei H, Jiang C. Chlorotoxin-modified macromolecular contrast agent for MRI tumor diagnosis. Biomaterials. 2011. 32(22):5177-5186.
- Komposch C. Scorpions and scorpion-venoms from the biological and human medical point of view (Arachnida, Scorpiones). Denisia. 2010; 30(20): 279-317.
- Laurentis J. O que é epítipo. Jornal Livre, 2008. Disponível em: <<http://www.jornallivre.com.br/153921/o-que-e-epitopo.html>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- Leis LB, Chebabo A. Diretrizes diagnósticas de acidentes com animais peçonhentos. Serviço de doenças infecciosas e parasitárias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Lenz G. Métodos imunológicos. Biofísica, 2004.

Lent R. Cem bilhões de neurônios - conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

Lira-da-Silva RM, Amorim AM, Brazil TK. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones;Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33(3):239-245.

Loret EP, Sampieri F, Granier C, Miranda F, Rochat H. Scorpion toxins affecting insects. Scorpion toxins affecting insects. In: Conn MP. Ed. Neurotoxins, United Kingdom, San Diego: Academic Press, 423p. 1992.

Lourenço WR, Cuellar O. Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. J. Venom. Anim. Toxins. 1995;1(2).

Lourenço WR, Von Eickstedt VRD. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 468f. São Paulo: Sarvier. 2003. p. 182-197.

Lourenço WR. Parthenogenesis in Scorpions: some history – new data. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2008;14(1).

Machado A, Liria CW, Proti PB, Remuzgo C, Miranda MTM. Síntese química enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. Química Nova. 2004;27(5):781-789.

Machado-De-Ávila RA, Alvarenga LM, Tavares CA, Molina F, Granier C, Chávez-Olortegui C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. Toxicon. 2004;44(3):233-241.

Machado-De-Ávila RA. Predição de epítomos descontínuos ou conformacionais em proteínas através da bioinformática estrutural [tese de doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.

Machado-De-Ávila RA, Velloso M, Oliveira D, Stransky S, Flor-Sá A, Schneider FS, Neshich G, Chávez-Olortegui C. Induction of neutralizing antibodies against mutalysin-ii from lachesis muta muta

snake venom elicited by a conformational b-cell epitope predicted by blue star sting data base. *J Immunol Res.* 2014;(11)1.

Mamelak AN, Rosenfeld S, Bucholz R, Raubitschek A, Nabors LB, Fiveash JB, Shen S, Khazaeli MB, Colcher D, Liu A, Osman M, Guthrie B, Schade-Bijur S, Hablitz DM, Alvarez VL, Gonda MA. Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2006;24(22):3644-3650.

Marcussi S, Arantes EC, Soares AM. *Escorpiões: biologia, envenenamento mecanismos de ação de suas toxinas.* 1. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2011.

Maria WS, Velarde DT, Alvarenga LM, Nguyen C, Villard S, Granier C, Chávez-Olórtegui C. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon.* 2005;46(2):210-227.

Martin-Eauclaire MF, Alamini M, Giamarchi A, Missimili JP, Rosso PEB. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine.* 2005;24:1990-1996.

Melo L. Imunohematologia Eritrocitária. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* São Paulo, v. 34, n. 3, 2012.

Mendes BBRO. Estudo da toxina Ts1 nativa e recombinante de *Tityus serrulatus* na produção de soro neutralizante [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.

Mendes TM, Oliveira D, Figueiredo LF, Machado-de-Ávila RA, Duarte CG, Dias-Lopes C, Guimarães G, Felicori L, Minozzo JC, Chávez-Olórtegui C. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine.* 2013;31(25):2749-55.

Mendes TM. Antígenos para a produção de soro contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* [tese de doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.

Mendes TM, Dias F, Horta CC, Pena IF, Arantes EC, Kalapothakis E. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon*. 2013;52(7):787-793.

Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC. 2009. p. 19-124.

Moreira DM, Moreira JSR, Fritscher LG, Garcia RG, Rymer S. Anéis de kayser-fleischer. *Arq. Bras. Oftalmol*. 2001;64(6).

Muro LFF, Ferreira LL, Gonzaga PAL, Pereira REP. Relação antígeno-anticorpo. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 2009;7(12).

Murphy K. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed. 2014.

Parham P. *O sistema imune*. 3ª ed. Porto Alegre: Aetmed. 2011.

Pellequer JL, Westhof E. PREDITOP: a program for antigenicity prediction. *Journal of Molecular Graphics*. 1993;11(3):202-210.

Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes EC. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, v. 39, n. 1, p. 1495-1504, 2001.

Pinheiro CB, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003;59(3):405-415.

Pinheiro LM, Acra LA. O conhecimento de recursos alternativos em pesquisa com animais de laboratório. *Estud. Biol*. 2007;29(67):157-163.

Pintar A, Possani LD, Delepierre M. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol*. 1999;287(2):359-367.

Polikarpov I, De Oliveira RT, Abrahão-Neto J. Preparation and preliminary X-ray diffraction studies of a new crystal form of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1999;55(pt. 9):1616-1617.

Rodríguez-de-la-Vega RC, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. 2004;43(8): 865-75.

Neshich G, Togawa RC, Mancini AL, Kuser PR, Yamagishi ME, Pappas G Jr, Torres WV, Fonseca e Campos T, Ferreira LL, Luna FM, Oliveira AG, Miura RT, Inoue MK, Horita LG, de Souza DF, Dominiquini F, Alvaro A, Lima CS, Ogawa FO, Gomes GB, Palandrani JF, dos Santos GF, de Freitas EM, Mattiuz AR, Costa IC, de Almeida CL, Souza S, Baudet C, Higa RH. Sting Millennium: A web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3386-3392.

Oren R, Phillips N, Ewers BE, Pataki DE, Meconigal JP. Sap-flux-scaled transpiration responses to light, vapor pressure deficit, and leaf area reduction in a flooded *Taxodium distichum* Forest. Tree Physiology. 1998;19:337-347.

Possani L, Steinmetz WE, Dent MA, Alagón AC, Wüthrich K. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. Biochim Biophys Acta. 1981;669(28):183-192.

Possani LD, Martin BM, Svendsen IB. The primary structure of noxiustoxin: A K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. Carlsberg Res. Commun. 1982;47(5):285-289.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. Eur J Biochem. 1999;264(2):287-300.

Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochemical Journal. 1985;229(3):739-750.

Potocnakova L, Bhide M, Pulzova, LB. An introduction to B-cell epitope mapping and in silico epitope prediction. *J Immunol Res.* 2016;2016:1-11.

Prendini L, Wheeler WC. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics.* 2005;21:446-494.

Querido, S.M.R. Antígenos. Disponível em: <http://fapi.br/conteudo/conteudo_programatico/farmacia/cpsp-antigenos_guilherme-silvia.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2016.

Ramos L, Labat R, Carvalho FAS, Martin AB, Lopes-Martins RAB. Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 2016;12(4):169-174.

Revelo MP, Bambirra EA, Ferreira AP, Diniz CR, Chavez-Olortegui C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon.* 1996;34(10):1119-1125.

Reckziegel GC. Análise do escorpionismo no Brasil no período de 2000 a 2010 [dissertação mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília; 2013.

Rhodes G. *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*, 3. ed. Academic Press, 2006.

Ribeiro EL, Melo MM. Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon.* 2010;55(6):1125-1131.

Rjeibi I, Mabrouk K, Mosrati H, Berenguer C, Mejdoub H, Villard C, Laffitte D, Bertin D, Ouafik L, Luis J, Elayeb M, Srairi-Abid N. Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides.* 2011;32(4):656-663.

Silva KABS. Caracterização dos efeitos do Plumierídeo, um iridóide isolado de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos de inflamação e dor [dissertação de mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

- Soares, KSR. Aplicação de nanopartículas de quitosana com potencial de adjuvante na produção de soro contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* [dissertação de mestrado]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2012.
- Sun Y, Kanekar SL, Vetter ML, Gorski S, Jan Y, Glaser T, Brown NL. Conserved and divergent functions of *Drosophila atonal*, amphibian, and mammalian Ath5 genes. *Evolution & Development*. 2003;5(5):532-541.
- Torres JB, Marques MGB, Martini RK, Borges CVA. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Rev Saúde Pública*. 2002;36(5):631-633.
- Van Regenmortel MHV. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods*. 1996;9(3):465-72.
- Valdivia, HH, Kirby, MS, Lederer, WJ, Coronado, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1992;89:12185-12189.
- Vasconcelos F, Lanchote VL, Bendhack LM, Giglio JR, Sampaio SV, Arantes EC. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comp Biochem Physiol Physiol*. 2005;141(1):85-92.
- Zachary L. Bergeron e Jon-Paul Bingham. Scorpion Toxins Specific for Potassium (K⁺) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. *Toxins*. 2012;4(11):1082-1119.
- Zamudio KR, Jones KB, Ward RH. Molecular systematics of short-horned lizards: biogeography and taxonomy of a widespread species complex. *Syst. Biol*. 1997;46(2):284-305.
- Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets*. 2004;5:1-15.

Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell*. 2003;5(5):811-816.

ANEXO

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Predições e caracterizações de epitopos conformacionais das toxinas do veneno do escorpião Tityus serrulatus (LUTZ; MELLO, 1922)."**, registrada com o protocolo nº **020/2016-2**, sob a responsabilidade de **Ricardo Andrez Machado de Ávila**, junto à equipe: **Márcia Pereira, Juliana Pasini de Souza, Mirian Ivens Fagundes, Luiza Macarini Bosa, Celiana Maria Ferrarini Triches, Ellen De Pieri, Emily Córneo** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **06/09/2016**.

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 15/09/2016 a 30/11/2017 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo isogênico Swiss |
| Nº de animais | 60 |
| Idade/Peso | 28-35 dias / 18-22g |
| Sexo | Feminino |
| Origem | Biotério da Unesc |

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: **"Predictions and characterizations of conformational epitopes of the toxins of the venom of the scorpion Tityus serrulatus (LUTZ; MELLO, 1922)."**

Protocol number: **020/2016-2**

Principal Investigator: **Ricardo Andrez Machado de Ávila**

Researchers: **Márcia Pereira, Juliana Pasini de Souza, Mirian Ivens Fagundes, Luiza Macarini Bosa, Celiana Maria Ferrarini Triches, Ellen De Pieri, Emily Córneo.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 06 de setembro de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

Criciúma
2017